

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakologie

Untersuchungen zur G-Protein Interaktion der Variante Gβ3s mit Gγ-Untereinheiten

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Axel Erik Ludwig
aus Riesenbeck
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. W. Siffert

2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Kribben

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2006

Veröffentlichungen:

Roskopf, D., Koch, K., Habich, C., Geerdes, J., Ludwig, A., Wilhelms, S., Jakobs, K.H., Siffert, W. (2003): Interaction of Gbeta3s, a splice variant of the G-protein Gbeta3, with Ggamma- and Galpha-proteins. *Cell Signal* 15(5), 479-488.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	7
1.1. <i>G-Proteine und G-Protein-vermittelte Signaltransduktion</i>	
1.1.1. Grundlagen der Signaltransduktion	8
1.1.2. Bedeutung und Klassifikation heterotrimerer G-Proteine	8
1.1.3. Der GTPase-Zyklus	10
1.1.4. G-Proteinfamilien und ihre typischen Effektoren	12
1.1.5. Strukturelle Betrachtungen zu G $\beta\gamma$ - Dimeren	15
1.2. <i>Entdeckung und Klonierung von Gβ3s</i>	17
1.2.1. Identifikation des zellulären Phänotyps einer gesteigerten Signaltransduktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie	18
1.2.2. Klonierung, Struktur und Genese von G β 3s	19
1.2.3. Fragestellung dieser Arbeit	21
2. Materialien	24
2.1. <i>Chemikalien</i>	24
2.2. <i>Fertige Lösungen und Kits</i>	25
2.3. <i>Radiochemikalien</i>	25
2.4. <i>Antikörper</i>	26
2.5. <i>Lösungen und Medien für die Zellkultur</i>	26
2.6. <i>Sonstige Materialien</i>	27
2.7. <i>Lösungen für die Präparation von Plasmamembranen</i>	27
2.8. <i>Lösungen für die tryptische Spaltung von Proteinen</i>	28
2.9. <i>Lösungen und Puffer für die SDS-Gelelektrophorese</i>	28
2.10. <i>Lösungen für den Elektrotransfer</i>	30
2.11. <i>Lösungen für die Westernblotanalyse</i>	30
2.12. <i>Lösungen für den GTPγS-Bindungsassay</i>	31
2.13. <i>Lösung für die Coomassie-Färbung</i>	32
3. Methoden	33
3.1. <i>Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen</i>	33
3.1.1. Einführung in das System	33

3.1.2. Kultur von Sf9-Insektenzellen	35
3.1.3. Nachamplifikation von Baculoviren	36
3.1.4. Infektion von Sf9-Zellen für die Herstellung rekombinanter Proteine	36
3.1.5. Präparation von Plasmamembranen	37
3.1.6. Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.2. <i>Tryptische Spaltung und Nachweis der Proteine im Westernblot</i>	39
3.2.1. Spaltung mit Trypsin	39
3.2.2. Spaltung mit Proteinase Arg-C	39
3.2.3. Kontrolle der enzymatischen Spaltung im Westernblot	40
3.2.4. Elektrophorese	40
3.2.5. Elektrotransfer	41
3.2.6. Immunologischer Nachweis	42
3.2.7. Nachweis der Chemilumineszens	42
3.3. <i>Nachweis der Funktionalität von Gβ3 im GTPγS-Bindungsassay</i>	43
3.3.1 Allgemeines zum Bindungsassay	43
3.3.2. Durchführung	43
4. Ergebnisse	45
4.1. <i>Expression von Gβ- und Gγ- Untereinheiten in Sf9-Zellen</i>	45
4.1.1. Expression von Gβ1 und Gβ2	46
4.1.2. Expression von Gβ3 und Gβ3s	47
4.1.3. Expression von Gγ - Untereinheiten	48
4.2. <i>Funktioneller Nachweis von Gβ3 und Gβ3s in Sf9-Zellen</i>	49
4.3. <i>Analyse der Protektion vor tryptischer Degradation</i>	50
4.3.1. Analyse von Gβ1γ - und Gβ2γ-Dimeren	50
4.3.2. Analyse von Gβ3γ - Dimeren	52
4.3.3. Analyse von Gβ3sγ - Dimeren	53
4.3.4. Analyse von Gβ3sγ - Dimeren mit der Proteinase Arg – C	54
5. Diskussion	55
5.1. <i>Existenz von Gβ3sγ - Dimeren</i>	56
5.2. <i>„Schutz vor tryptischem Verdau“ – Grenzen der Methodik</i>	56
5.3. <i>Wichtige Regionen im Gβ - und im Gγ - Molekül für die Dimerbildung</i>	59
5.4. <i>Funktionelle Ergebnisse von Gβ3γ - Dimeren</i>	60

<i>5.5. Bedeutung der $G\beta\gamma$ - Heterogenität und der gesteigerten Signaltransduktion im Falle von $G\beta 3s$ in Bezug auf das kardiovaskuläre System</i>	62
5.5.1. Hypertonie	63
5.5.2. Linksventrikuläre Hypertrophie	64
5.5.3. Koronare Herzkrankheit	64
5.5.4. Umweltfaktoren und andere Einflüsse	65
6. Zusammenfassung	66
7. Literaturverzeichnis	67
8. Abkürzungsverzeichnis	76
9. Danksagung	78
10. Lebenslauf	79

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit grundlegenden Eigenschaften von G β 3s, einer Spleißvariante der G-Proteinuntereinheit G β 3. G β 3s wurde im Rahmen eines systematischen Sequenzierprojektes gefunden, bei dem nach Polymorphismen in G-Protein-Genen gefahndet wurde. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Siffert hatten gezeigt, dass Patienten mit arterieller Hypertonie teilweise einen Phänotyp einer gesteigerten Signaltransduktion exprimieren, der genetisch fixiert ist und möglicherweise zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt. Da diese veränderte Signaltransduktion Wege umfasst, die über heterotrimere G-Proteine vermittelt werden, lag es nahe in deren Genen nach Mutationen zu suchen. Dabei wurde ein Polymorphismus (C825T) im Gen der G-Proteinuntereinheit G β 3, *GNB3*, entdeckt. Das T-Allel dieses Polymorphismus ist mit dem Auftreten einer essentiellen Hypertonie assoziiert. Ausserdem wurde bei Trägern des T-Allels die oben erwähnte Spleißvariante G β 3s entdeckt, die diese vermehrt exprimieren. Bei G β 3s handelt es sich um eine Deletionsvariante von G β 3. Gegenstand dieser Arbeit ist daher zu überprüfen, inwieweit G β 3s typische Eigenschaften von G β -Proteinen besitzt und ob G β 3s als ein möglicher Kandidat für die Genese der beobachteten Steigerung der G-Proteinabhängigen Signaltransduktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie in Frage kommt.

Soweit es für das Verständnis erforderlich ist, stellt diese Einleitung zum einen das System der heterotrimeren G-Proteine, ihre Struktur und ihre Funktion vor. Ein weiterer Schwerpunkt wird auf G β 3, das Gen *GNB3* und die Entstehung von G β 3s gelegt. Ein wichtiges Charakteristikum von G β -Proteinen, das auch in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Fähigkeit mit G γ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden. Daher werden kurz G γ -Untereinheiten und Methoden zum Nachweis der G β -G γ Dimerisierung vorgestellt. Schließlich wird kurz auf Aspekte der Entdeckung von G β 3s und sein Bezug zur arteriellen Hypertonie eingegangen.

1.1. G-Proteine und G-Protein-vermittelte Signaltransduktion

1.1.1. Grundlagen der Signaltransduktion

Alle Zellen besitzen die Eigenschaft, Informationen, die sie aus ihrer Umgebung erhalten, ins Zellinnere weiterzuleiten. Hunderte chemischer und physikalischer Signale wirken so dauernd auf die Zelloberfläche ein. Die meisten dieser Signale treten dabei nicht direkt in die Zelle ein, sondern binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und bewirken eine Konformationsänderung des entsprechenden Rezeptors, die in das Zellinnere übertragen wird (Ausnahme z.B. Steroid- oder Schilddrüsenhormone, die die Zellmembran passieren und mit intrazellulären Rezeptoren interagieren).

Man unterscheidet verschiedene Rezeptorklassen, die sich in ihren Prinzipien der Informationsweiterleitung unterscheiden. Bei ligandengesteuerten Ionenkanälen kommt es durch die Bindung eines Agonisten zur Öffnung eines Ionenkanals. Typisches Beispiel für diesen Rezeptortyp ist der nikotinerge Acetylcholinrezeptor. Bei der zweiten großen Rezeptorklasse, den Rezeptortyrosinkinasen, kommt es durch Bindung des Liganden zu einer Rezeptordimerisierung und der Aktivierung der Tyrosinkinase, die sich auf einer intrazellulären Domäne des Rezeptors befindet. Typisches Beispiel für diesen Rezeptortyp ist der Insulinrezeptor (Malbon 2004).

Die größte Familie von Rezeptoren bilden jene, die an G-Proteine koppeln. Da diese Rezeptoren die Zellmembran siebenmal durchqueren, nennt man sie auch heptahelikale Rezeptoren (Dohlman et al., 1991). Beispiele für solche Rezeptoren, sind Katecholaminrezeptoren (α - und β -Adrenozeptoren), muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, Rezeptoren für Cytokine und chemotaktische Peptide (z.B. fMLP), Rezeptoren für Gonadotropine und viele andere mehr.

1.1.2. Bedeutung und Klassifikation heterotrimerer G-Proteine

Der Name „G-Proteine“ beruht auf ihrer Fähigkeit Guaninnukleotide, also GDP oder GTP, zu binden. Bei den im Folgenden untersuchten G-Proteinen handelt es sich um heterotrimere G-Proteine, die sich – im Gegensatz zu den monomeren G-Proteinen wie z.B. dem ras-Protein – aus drei Untereinheiten zusammensetzen,

welche mit α , β , und γ bezeichnet werden. Dabei liegt das Molekulargewicht je nach Isoform bei den $G\alpha$ -Untereinheiten zwischen $\sim 42 - 46$ kDa, bei den $G\beta$ -Untereinheiten zwischen $\sim 35 - 37$ kDa und den $G\gamma$ -Untereinheiten bei $7 - 8$ kDa (Hepler, Gilman, 1992). *In vivo* treten $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit nach Dimerisierung jeweils als funktionelles Monomer auf, d.h. sie können nur unter artefiziellen denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden (Schmidt, Neer, 1991). Eine Ausnahme bildet $G\beta_5$, das sich von den anderen $G\beta$ -Proteinen $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ und $G\beta_4$ deutlich unterscheidet und möglicherweise *in vivo* auch als Monomer existieren kann (Yoshikawa et al., 2000). Heterotrimere G-Proteine befinden sich auf der Innenseite der Zellmembran (Hepler, Gilman 1992; Spiegel et al., 1992; Iñiguez-Lluhi et al., 1993) (siehe Abb. 1). $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten verfügen über Lipidmodifikationen (Palmitoylierungen von $G\alpha$ -Untereinheiten; Isoprenylierungen von $G\gamma$ -Untereinheiten), die für die submembranäre Lokalisation mitverantwortlich sind (Muntz et al., 1992).

Man kennt beim Menschen derzeit Gene für 21 verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten, 5 $G\beta$ -Untereinheiten und 12 $G\gamma$ -Untereinheiten (Farfel et al., 1999; Gautam et al., 1998; Jones et al., 2004). Nach derzeitigem Kenntnisstand können nicht alle $G\beta$ - und $G\gamma$ Untereinheiten miteinander interagieren (Spring, Neer, 1994; Schmidt et al., 1992; Gautam et al., 1998; Kerchner et al., 2004; Mayeenuddin et al., 2005). Die Benennung eines heterotrimeren G-Proteins richtet sich definitionsgemäß nach der $G\alpha$ -Untereinheit. So unterteilt man die $G\alpha$ -Untereinheiten in vier Familien: $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12}$ (Cabrera-Vera et al., 2003). Bei allen $G\alpha$ Untereinheiten handelt es sich um Enzyme mit GTPase Aktivität. Mitglieder der Familien $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ weisen spezifische Sequenzmotive auf, die von Bakterientoxinen kovalent modifiziert werden können. Cholera toxin z.B. modifiziert einen bestimmten Arginin-Rest in $G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_s$ -Familie, die zu einer Daueraktivierung des Proteins durch Hemmung der GTPase Aktivität führt. Im Falle von Pertussis toxin (PTX) kommt es zur ADP-Ribosylierung eines bestimmten Cystinrestes am carboxyterminalen Ende von $G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_i$ Familie (Hepler, Gilman, 1992). Hierdurch wird die Interaktion vom G-Protein mit dem Rezeptor gehemmt, was sich in einer Inaktivierung entsprechender Signalwege manifestiert.

Aus Untersuchungen zur Kristallstruktur weiß man, dass die $G\alpha$ -Untereinheit aus zwei Domänen besteht: einer GTPase Domäne, welche die Bindungsstellen für

Guaninnukleotide, Rezeptoren und Effektoren enthält (Gilman, 1987; Conklin, Bourne, 1993; Hamm 1998). Die Funktion der anderen Domäne ist unklar, sie ist helikal ausgerichtet (Neer, 1995). Die Struktur des $G\beta\gamma$ -Dimers wird weiter unten noch eingehend besprochen werden.

1.1.3. Der GTPase-Zyklus

Nachdem wir uns im vorausgehenden Abschnitt mit Klassifikations- und Strukturfragen von heterotrimeren G-Proteinen beschäftigt haben, soll im Folgenden kurz ihre Funktion näher beschrieben werden, die als so genannter GTPase-Zyklus bekannt ist.

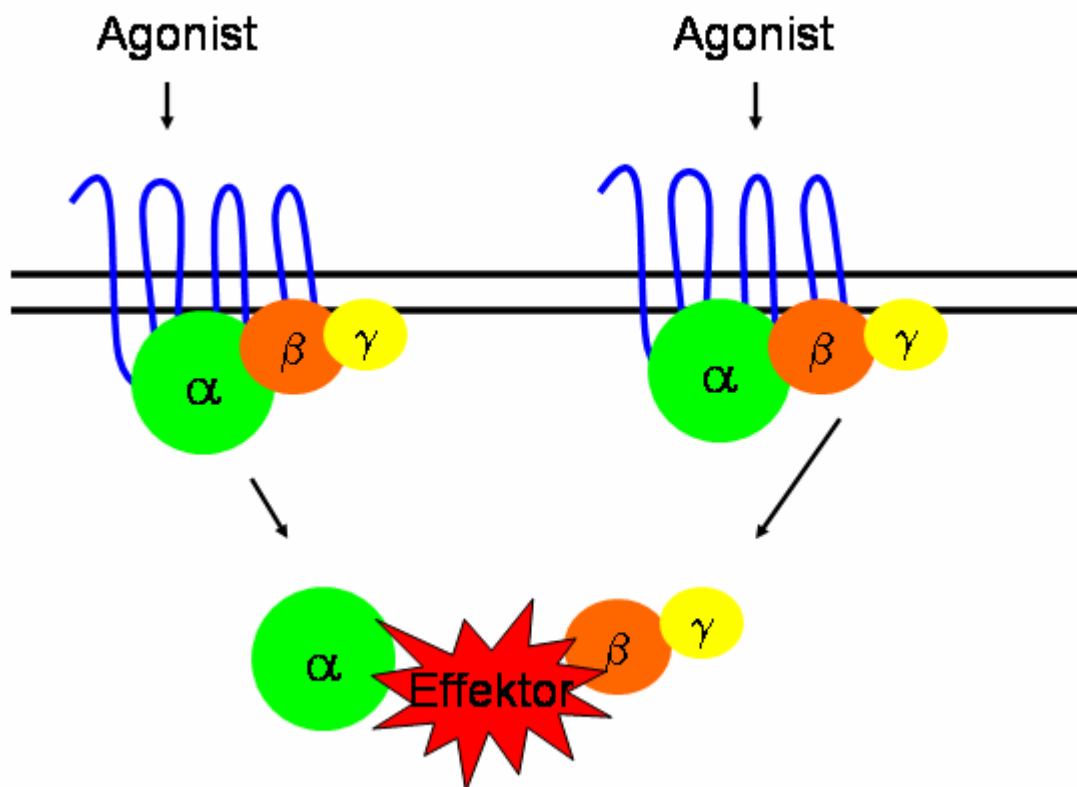


Abb.1: Durch Aktivierung mit einem Agonisten ändert der heptahelikale Rezeptor (blau) seine Konformation, dadurch können die G-Protein Untereinheiten (grün, orange, gelb) ihrerseits Effektoren regulieren. Die Zellmembran ist als Bilayer schwarz dargestellt.

Im inaktiven Zustand trägt die $G\alpha$ -Untereinheit ein Molekül GDP und bildet mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer das bereits erwähnte heterotrimere G-Protein. Dieses Heterotrimer ist in der Lage, mit heptahelikalen Rezeptoren zu interagieren. Nach gängiger Auffassung wird die Spezifität dieser Rezeptor - G-Protein Interaktion durch die Zusammensetzung des Heterotrimers bestimmt. Mechanistisch betrachtet, stabilisiert dabei das $G\beta\gamma$ -Dimer die Wechselwirkung der $G\alpha$ -Untereinheit mit dem Rezeptor (Neer, 1995). Wenn es zu einer Aktivierung des heptahelikalen Rezeptors durch Bindung eines spezifischen Liganden kommt, führt dies zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die sich auf ein interagierendes G-Protein im GDP-Zustand überträgt. Die $G\alpha$ -Untereinheit öffnet ihre Bindungstasche, GDP dissoziiert und sein Platz wird von GTP eingenommen, das in der Zelle in einer wesentlich höheren Konzentration als GDP vorkommt. Die Bindung von GTP an die $G\alpha$ -Untereinheit führt zu einer weiteren Konformationsänderung, die der Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit entspricht (GTP-Zustand). In diesem Zustand verliert die $G\alpha$ -Untereinheit ihre Affinität für den Rezeptor und die $G\beta\gamma$ -Untereinheit, so dass es zu einem Zerfall des Multiproteinkomplexes kommt. Die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit ist in der Lage, spezifische Effektoren – wie z.B. Adenylzyklasen oder Isoformen der Phospholipase C (PLC) – zu stimulieren. Dabei erfolgt die Interaktion der aktivierten $G\alpha$ -Untereinheit mit den genannten Effektoren überwiegend über Kontaktpunkte, die im Heterotrimer durch das $G\beta\gamma$ -Dimer blockiert sind. Das in diesem Szenario frei gewordene $G\beta\gamma$ -Dimer ist ebenfalls in der Lage $G\beta\gamma$ -abhängige Effektoren zu regulieren. Solche Effektoren umfassen u.a. Isoformen der PLC, bestimmte Kaliumkanäle, Rezeptorkinasen oder die MAP-Kinasen Kaskade (Logothetis et al., 1987; Katz et al., 1992; Crespo et al., 1994; van Biesen et al., 1996; Faure et al., 1994). Zeitlich begrenzt wird dieser Aktivierungszustand durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, die zu einer Hydrolyse des gebundenen GTP führt (Gilman, 1987). Hierdurch nimmt die $G\alpha$ -Untereinheit wieder ihren GDP-Zustand ein und ist in der Lage mit einem $G\beta\gamma$ -Dimer wieder ein Heterotrimer zu bilden. Da auf diese Weise ein G-Protein mehrfach aktiviert werden kann und ein Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren kann, kommt es zu einer frühen Amplifikation des Signals.

Anzumerken ist, dass die GTPase-Aktivität der verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten erheblich variiert (Carty et al., 1990; Linder et al., 1990). Außerdem unterscheiden

sich $G\alpha$ -Untereinheiten in ihrer basalen Aktivierung, d.h. in dem Ausmaße, wie $G\alpha$ -Untereinheiten auch ohne Rezeptorstimulation ihr GDP verlieren und damit in den aktivierten Zustand gelangen (van Biesen et al., 1996; Hepler, Gilman, 1992).

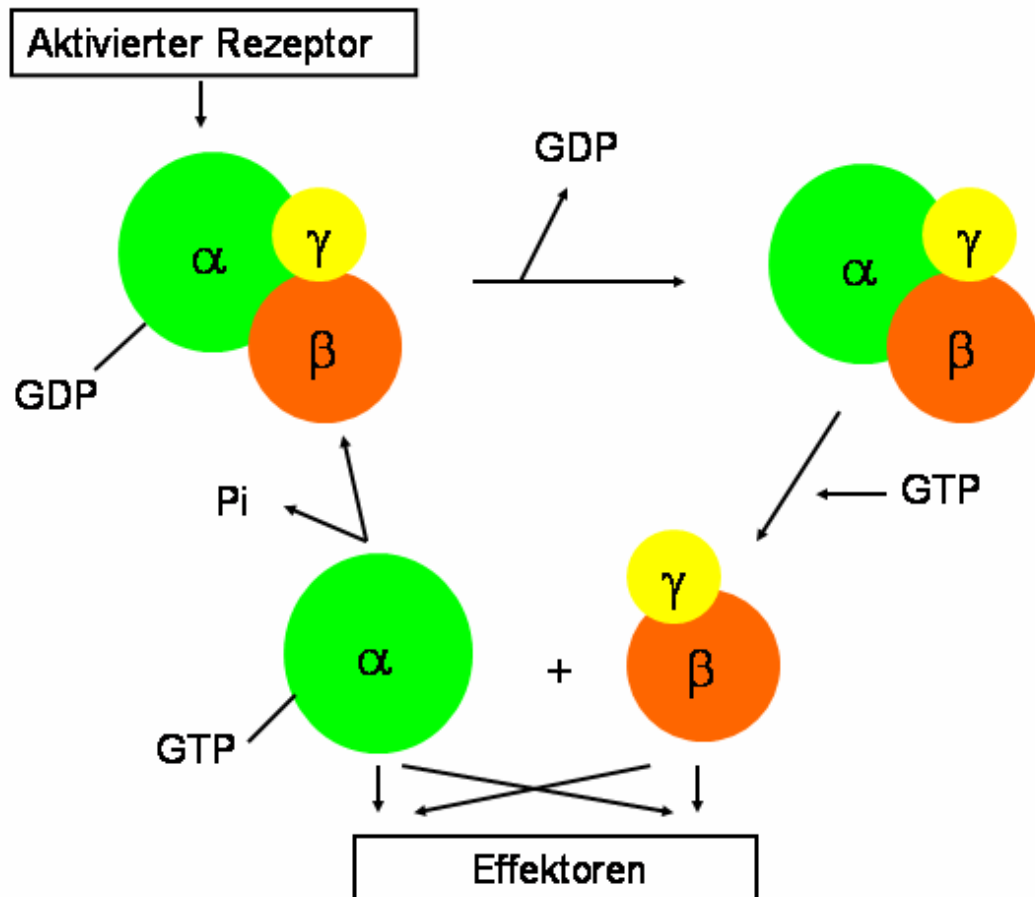


Abb.2: Der GTPase -Zyklus (Erklärung siehe Text)

1.1.4. G-Proteinfamilien und ihre typischen Effektoren

Im Folgenden soll etwas näher auf die verschiedenen G-Proteinfamilien eingegangen werden und auf die Effektoren, die sie typischerweise regulieren. Angemerkt sei, dass sich im Einzelfall diese Verhältnisse z. T. zelltypspezifisch weit komplexer darstellen.

Klassische Effektoren von heterotrimeren G-Proteinen sind - wie bereits ausgeführt - Ionenkanäle, Phospholipasen, Adenylzyklen oder die MAP-Kinasenkaskade. Sie stellen nach dem aktivierten G-Protein das nächste Glied in der

Kette der Signalübertragung dar. Zyklisches AMP (cAMP) ist historisch das erste Beispiel eines *second messenger*; es wird durch Adenylylzyklasen generiert. Mittlerweile sind 7 Isoformen dieses Enzyms bekannt, die durch $G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_S$ -Familie aktiviert werden können. Während $G\alpha_{olf}$ nur im olfaktorischen Neuroepithel vorkommt (Jones, Reed, 1989), sind die beiden anderen $G\alpha_S$ Isoformen (Spleißvarianten), $G\alpha_{S(s)}$ und $G\alpha_{S(L)}$, ubiquitär exprimiert (Hepler, Gilman, 1992). Neben der Regulation der Adenylylzyklase spielen sie möglicherweise bei der Regulation von Ionenkanälen eine Rolle (Mattera et al., 1989; Schubert et al., 1989).

Die $G\alpha_i$ -Familie besteht aus den $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_{i1-3}$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_t$. $G\alpha_t1$ (Transduzin) kommt nur in den äußeren Stäbchen der Retina vor (Hepler, Gilman, 1992). Nach Aktivierung stimuliert es eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase, welche in der Retina eine Erniedrigung der intrazellulären cGMP Konzentration bewirkt. Dies ist ein wesentlicher Schritt des Sehvorgangs. $G\alpha_t2$ ist ein Transducinohomolog gleicher Funktion, das in den Zapfen der Retina vorkommt. Die G-Proteine $G\alpha_{i1-3}$ hemmen die Aktivität verschiedener Adenylylzyklase Isoformen. Da sie recht abundant exprimiert werden, kommt es nach Aktivierung von $G\alpha_i$ -Proteinen zur Freisetzung einer großen Zahl von $G\beta\gamma$ -Dimeren, die ihrerseits, - wie weiter unten beschrieben – an der Regulation von Phospholipase C Isoformen, der MAP-Kinasen Kaskade und von Kaliumkanälen beteiligt sind (Cabrera-Vera et al., 2003). Ein weiteres Charakteristikum für Proteine der $G\alpha_i$ -Familie ist – wie bereits ausgeführt – ihre Sensitivität gegenüber PTX, das zu einer funktionellen Inaktivierung dieser Proteine führt (Neer et al., 1984; Gierschick et al., 1987).

$G\alpha$ -Untereinheiten der $G\alpha_q$ Familie – aber auch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten – können Isoformen der Phospholipase $C\beta$ aktivieren. Durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat in Inositol 1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol werden Ca^{2+} Signale ausgelöst und Isoformen der Proteinkinase C stimuliert (Tovey & Willars 2004). Zur Familie der $G\alpha_q$ -Familie gehören neben $G\alpha_q$ auch $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$, wobei $G\alpha_{15}$ nur das Maushomolog des humanen $G\alpha_{16}$ bezeichnet. Die Proteine der $G\alpha_{12}$ Familie - also $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ - sind an der Regulation des Zytoskeletts und der Aktivierung von z.B. Rho-Proteinen beteiligt (Buhl et al., 1995).

Während man in den Anfangsjahren der G-Proteinforschung davon ausging, dass die aktivierten $G\alpha$ -Untereinheiten die wesentlichen Regulatoren von Effektoren darstellen, hat man zwischenzeitlich gelernt, dass freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten wichtige

Regulatoren zahlreicher Effektoren sind. So wurde gezeigt, dass $G\beta\gamma$ -Komplexe direkt Kaliumkanäle, z.B. im Herzvorhof, aktivieren können (Logothetis et al., 1987). Solche Kaliumkanäle kommen auch in vielen anderen Geweben vor (Lesage et al., 1994; Ferrer et al., 1995).

Daneben sind freie $G\beta\gamma$ -Dimere wichtige Aktivatoren der PLC-Isoformen PLC β 2 und PLC β 3 (Boyer et al., 1992; Camps et al., 1992). Entsprechend kommt es nach Freisetzung von $G\beta\gamma$ -Dimeren in geeigneten Zellen zu einer Produktion von IP₃, Calciumsignalen und der Aktivierung von PKC-Isoformen (Clapham, 1995). Die Calciumkonzentration der Zelle wird dadurch innerhalb von Sekunden drastisch erhöht und kann wiederum weitere Signalkaskaden aktivieren, die je nach Zelltyp in Migration, Kontraktion, Sekretion oder Proliferation münden können.

$G\beta\gamma$ -Untereinheiten sind darüber hinaus auch an der Regulation von Isoformen der Adenylylzyklase beteiligt. So hemmen freie $G\beta\gamma$ -Dimere die Isoform AC1, während sie die Isoformen AC2 und AC4 synergistisch mit GTP-beladenem $G\alpha_s$ stimulieren können (Tang, Gilman, 1991).

Eine weitere Gruppe von Effektoren, die von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten reguliert werden, sind die Rezeptorkinasen (GRK1-6, *G protein-coupled receptor kinases*), die an der Inaktivierung heptahelikaler Rezeptoren durch Phosphorylierung beteiligt sind. Bei einigen dieser Kinasen sind freie $G\beta\gamma$ -Dimere an der Translokation zur Zellmembran beteiligt (Inglese et al., 1993; Haga et al., 1994).

Weitaus komplexer als die eben geschilderten Signalwege ist die Proliferationskontrolle, an der ebenfalls zelltypabhängig freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten beteiligt sind. Insbesondere ist hier an die Aktivierung der MAP-Kinasenkaskade zu denken (Inglese et al., 1995). Klassische Aktivierungswege schließen neben $G\beta\gamma$ -Dimeren das kleine G-Protein Ras, die Raf-Kinase und die MEK-Kinase ein.

Wie bereits ausgeführt, erklärt man sich die beobachteten Spezifitäten bei der Rezeptor-Effektor-Kopplung zum Teil durch die Beteiligung spezifischer G-Proteinuntereinheiten in einem komplexen räumlichen und zeitlichen Beziehungsgeflecht.

1.1.5. Strukturelle Betrachtungen zu G β γ -Dimeren

Für das weitere Verständnis der Struktur und möglichen Funktion von G β 3s ist die Kenntnis um die G β -Struktur wesentlich. Sie soll im Folgenden kurz vorgestellt werden. Die fünf bekannten G β -Untereinheiten sind in ihrer Aminosäuresequenzen von 53 % (G β 5) bis zu 90% (G β 1, G β 2, G β 3 und G β 4) einander identisch (Clapham, Neer, 1997), wobei man die G β 1-4 Familie funktionell und evolutionsbiologisch G β 5 entgegenstellt.

Die G β -Untereinheiten bestehen aus zwei strukturell unterschiedlichen Regionen: Der Aminoterminal der Proteine besteht jeweils aus einer α -Helix von ca. 20 Aminosäuren, die u.a. für die Interaktion mit G γ -Untereinheiten verantwortlich ist (Gautam et al., 1998; Clapham, Neer, 1997) (siehe Abb.3). Kristallisationsanalysen beschreiben diesen Teil als Spiral oder „*coiled-coil*“ Domäne. Der Hauptteil der G β -Untereinheit besteht aus sieben so genannten *WD-Repeats*, die eine Propellerstruktur definieren (Sondek et al., 1996). Jede dieser WD-Domänen ist etwa 40 Aminosäuren lang, die 4 antiparallele β -Faltblätter ausbilden und somit die Grundstruktur jedes der sieben Propellerblätter bilden (Neer et al., 1994). Der Name *WD-Repeat* bezieht sich dabei auf die Aminosäuren Tryptophan und Asparagin, die neben anderen Sequenzmotiven an konservierten Stellen in diesen Domänen auftreten (Smith et al., 1999). WD-Domänen treten nicht nur als „Konstruktionsmerkmal“ von G β -Proteinen auf, sondern finden sich in vielen weiteren Proteinen, die die Familie der WD-Proteine begründen (Li & Roberts 2001). Mitglieder dieser Familie nehmen ganz unterschiedliche Funktionen wahr, so z.B. *mRNA-Splicing*, Transkriptionsregulation oder die Kontrolle des Zytoskeletts (Neer et al., 1994). Mechanistisch besteht die Funktion von WD-Domänen in ihrer Fähigkeit als Adaptorprotein mehrere Proteine zu einem Multiproteinkomplex zusammenzufassen (Smith et al., 1999).

Neben den erwähnten konservierten Regionen jedes *WD-Repeats* findet sich im Bereich des äußeren Stranges ein variabler Bereich, der wahrscheinlich für die Spezifität der Adaptorfunktion verantwortlich ist. Insgesamt nehmen die 7 *WD-Repeats* der G β -Proteine eine Ringstruktur ein, wobei in der linearen Abfolge der

Aminosäurekette nach dem N-Terminus das letzte β -Faltblatt des siebten Propellers erscheint, an den sich die weiteren Faltblätter der nachfolgenden WD-Domänen bis zum vorletzten Faltblatt der letzten WD-Domäne anschließen. Auf diese Weise kommt es zu einem Ringschluss, indem sich der Anfang und das Ende der Aminosäurekette zusammenlagern, was im Amerikanischen beschreibend als *velcro* Mechanismus bezeichnet wird. Geometrisch bildet dieser Ring eine so genannte Torusstruktur, die in der Mitte einen Tunnel umschließt (Sondek et al., 1996). Hierbei unterscheidet man an G β -Proteinen unterschiedliche Oberflächen: die α -Oberfläche, die γ -Oberfläche, der Ring aus den äußeren Strängen, die Oberfläche, die den zentralen Tunnel bildet und die Oberfläche der N-terminalen α -Helix.

Die Analyse der sich wiederholenden WD-Domänen von verschiedenen Organismen lässt vermuten, dass über die Evolution hinweg jede dieser Domänen eine spezielle Adaptorfunktion hat, und dass diese über die letzten 1,2 Milliarden Jahre hinweg konserviert wurden. (Clapham, Neer, 1997).

Ein obligater Partner des G β -Proteins – und vermutlich an der ordnungsgemäßen Faltung entscheidend beteiligt – ist die G γ -Untereinheit (siehe Abb.3). In ihrer Struktur entsprechen G γ -Untereinheiten einer großen α -Helix, die mit der *coiled-coil* Domäne der G β -Untereinheit interagiert (Clapham, Neer, 1997). Darüber hinaus interagiert die G γ -Untereinheit eng mit den Unterflächen der WD-Domänen 5, 6 und 7 und stabilisiert so das G $\beta\gamma$ -Dimer.

Im Gegensatz zu den G β -Untereinheiten weisen die G γ -Proteine eine sehr große Sequenzvariabilität auf. Derzeit gliedert man sie in vier große Gruppen (Gautam et al., 1998):

- I: G γ 1, G γ 8_C, G γ 11
- II: G γ 2, G γ 3, G γ 4
- III: G γ 7, G γ 12
- IV: G γ 5, G γ 8_{olf}, G γ 10

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird G γ 1 ausschließlich in den Stäbchen der Retina exprimiert. G γ 8_C findet sich analog in den Zapfen der Netzhaut, wird aber auch in anderen Geweben gefunden. In ähnlicher Weise weist auch G γ 11 eine weit verbreitete Expression auf. Während man G γ 3 und G γ 4 aus der Gruppe II fast überwiegend in neuronalen Geweben findet, findet sich G γ 2 wie G γ 7, G γ 5, G γ 10 und G γ 12 weit verbreitet. G γ 8_{olf} hingegen kommt im Riechepithel vor.

Die G_γ -Untereinheiten werden verschiedenen posttranslationalen Modifikationen unterzogen. Bei den G_γ 's der Gruppe I wird an einem Cystein nahe des C-terminalen Endes eine Farnesyl-Gruppe hinzugefügt (Fukada et al., 1990), bei den anderen G_γ -Proteinen ist es eine Geranylgeranyl-Gruppe. Aufgabe dieser Lipidmodifikation ist die Verankerung des $G\beta\gamma$ -Komplexes in der Zellmembran.

Die Dimerisierung von $G\beta$ - und G_γ -Untereinheit ist ein komplexer Prozess, der z.B. in Bakterien nicht erfolgreich verläuft. Für die ordnungsgemäße Faltung der $G\beta$ -Untereinheit sind neben einem geeigneten G_γ -Protein weitere Hilfsproteine, so genannte *Chaperonine* erforderlich (Clapham, Neer, 1997).

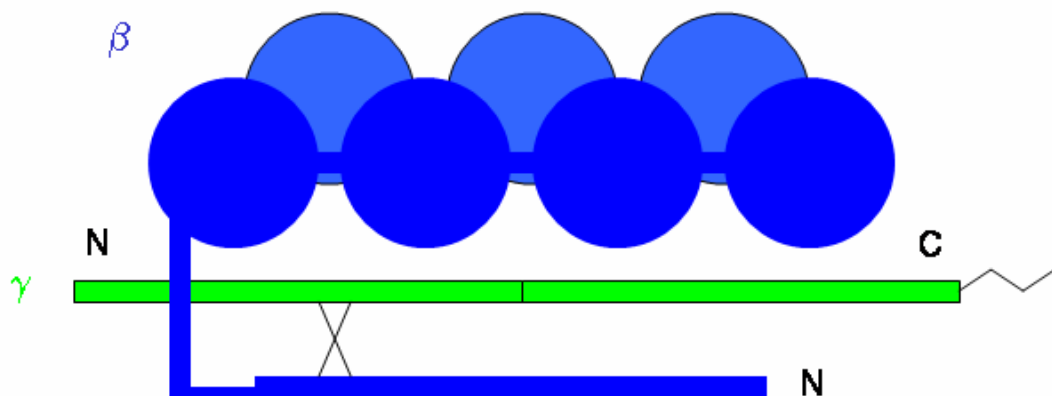


Abb.3: Dargestellt ist das $G\beta\gamma$ -Dimer. Die WD-Domänen sind als Kreise dargestellt, die durch die variablen Regionen verbunden sind. Die G_γ α -Helix breitet sich entlang der WD-Domänen von $G\beta$ aus.

1.2. Entdeckung und Klonierung von $G\beta 3s$

Gegenstand dieser Arbeit ist die biochemische Charakterisierung von $G\beta 3s$, einer Spleißvariante der $G\beta 3$ -Untereinheit. Für das weitere Verständnis soll kurz der Weg zu ihrer Identifikation vorgestellt werden. Anschließend wird kurz auf den bisherigen Kenntnisstand der molekularen Genese eingegangen werden.

1.2.1. Identifikation des zellulären Phänotyps einer gesteigten Signaltransduktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie

Herz- und Kreislauferkrankungen sind die häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt, wobei der arteriellen Hypertonie ein wesentlicher Beitrag als Risiko- und Manifestationsfaktor zukommt. Ohne auf die Details dieser Erkrankung näher eingehen zu wollen sei angemerkt, dass sie bei etwa 20 – 30% der Bevölkerung auftritt, wobei in den meisten Fällen (> 95%) eine klare Ursache nicht greifbar ist (so genannte essentielle Hypertonie) (Norman, 1998). Aktuelle Konzepte gehen davon aus, dass die Hypertonie im Rahmen des „Wohlstandsyndroms“ auftritt und dass z.B. Faktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel und Alkoholkonsum an ihrer Manifestation beteiligt sind. Neben Umweltfaktoren spielen insbesondere genetische Einflüsse ebenfalls eine wichtige Rolle, wobei von einem polygenetischen Geschehen auszugehen ist (Lifton, 1995). Um solche genetischen Faktoren näher aufzuklären, wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Siffert Zelllinien von Patienten mit arterieller Hypertonie und gesunden normotensiven Kontrollprobanden angelegt. Ziel war es, zelluläre Phänotypen außerhalb des hypertensiven Milieus zu analysieren. Technische und methodische Einzelheiten bei der Auswahl der Probanden und Patienten können einer Vielzahl von Publikationen entnommen werden (Siffert et al., 1995; Rosskopf et al., 1992; Rosskopf et al. 1995).

Bei der Analyse solcher zellulärer Phänotypen fiel auf, dass einige Zelllinien von Patienten mit Hypertonie über eine gesteigte Signaltransduktion verfügten (Siffert et al., 1995). Diese äußerte sich u.a. in einer gesteigten Bildung von IP_3 durch Hydrolyse, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration des *second messengers* Ca^{2+} kam, sowie in einer beschleunigten Proliferation nach Stimulation von Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine koppeln. „Früheste“ Änderung in der Signaltransduktion war dabei eine gesteigte $GTP\gamma S$ -Bindung nach Stimulation von heptahelikalen Rezeptoren oder nach direkter G-Proteinaktivierung mit dem Peptid Mastoparan (Siffert et al., 1995). $GTP\gamma S$ ist ein nichthydrolysierbares GTP-Analog das radioaktiv markiert erhältlich ist. Nach Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit kann $GTP\gamma S$ statt GTP stabil gebunden werden, d.h. es kommt zu keiner Hydrolyse. Damit ist es möglich, die G-Proteinaktivierung zu quantifizieren.

1.2.2. Klonierung, Struktur und Genese von Gβ3s

Fasst man die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse zusammen, so heißt dies, dass die G-Proteinaktivierung in Zellen einiger Patienten mit arterieller Hypertonie gesteigert ist (später wurde dieser Phänotyp auch bei (möglicherweise noch) normotensiven Kontrollpersonen gefunden). Es lag daher nahe, die in Frage kommenden G-Proteinuntereinheiten einer systematischen Sequenzanalyse zu unterziehen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde ein Polymorphismus (C825T) in der mRNA-Sequenz der G-Proteinuntereinheit Gβ3 gefunden. Interessanterweise steht dabei das T-Allel dieses Polymorphismus in enger Assoziation mit dem Phänotyp einer gesteigerten Signalübertragung. Ferner konnte in mehreren Studien eine Assoziation des T-Allels mit essentieller Hypertonie, Adipositas, (Siffert et al., 1998; Siffert et al., 1999; Schunkert et al., 1998; Siffert et al., 2000; Benjafield et al., 1998; Dong et al., 1999; Hengstenberg et al., 2001; Dong et al., 2004) sowie Arteriosklerose und Diabetes (Siffert, W., 2005) gezeigt werden. Allerdings blieben diese Ergebnisse nicht unwidersprochen (Kato et al., 1998; Larson et al., 2000; Snapir et al., 2001). Mechanistisch schwer verständlich blieb dabei, wie dieser Basenaustausch die G-Proteinfunktion beeinflussen sollte, da es sich um einen stummen Polymorphismus handelt, der entsprechend die Aminosäuresequenz nicht beeinflusst. In weiteren Analysen fiel dann auf, dass in Zellen von Trägern des 825T-Allels eine kürzere mRNA-Variante von Gβ3 vorkommt, die mit Gβ3s bezeichnet wird. Im Falle von Gβ3s fehlen 41 Aminosäuren, die dem Äquivalent einer WD-Domäne entsprechen. Mechanistisch erklärt sich dieser Wegfall durch ein alternatives Spleißen der Gβ3-mRNA (Siffert et al., 1998). Dabei ist ungewöhnlich, dass der *GNB3* C825T Polymorphismus keine konservierte Erkennungssequenz des Spleißapparates betrifft, sondern sich fast 1600 bp entfernt im nachfolgenden Exon befindet. Obwohl es einige wenige Beispiele in der Literatur gibt, die einen solchen Mechanismus nahe legen (Siffert et al., 1998), verwunderte dies doch etwas. Im Rahmen einer genauen Analyse des *GNB3* Gens wurden jedoch 6 weitere Polymorphismen entdeckt, die im engen Kopplungsungleichgewicht mit dem *GNB3* 825T- bzw. 825C-Allel stehen (Rosskopf et al., 2002). Hieraus wird eher plausibel, wie 6 Polymorphismen, die über die gesamte Prä-mRNA von *GNB3* verteilt sind, die Sekundärstruktur der mRNA beeinflussen und das alternative Spleißen

begünstigen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Gβ3s zwar gehäuft bei Trägern des 825T-Allels vorkommt, einzelne Transkripte aber auch bei homozygoten Trägern des 825C-Allels entdeckt wurden. Dies bedeutet, bei diesem genotypabhängigen alternativen Spleißen handelt es sich nicht um einen „Alles-oder-Nichts“ Vorgang. Es darf auch nicht übersehen werden, dass 825T-Allel Träger im Vergleich zu den 825C-Allelträgern viel häufiger Gβ3s-Transkripte generieren, dass aber absolut auch homozygote 825T-Allelträger am meisten das Wildtyptranskript von Gβ3 prozessieren.

Im weiteren Verlauf dieses Forschungsprojektes wurden noch zwei weitere Gβ3 Varianten entdeckt, die mit Gβ3s2 und Gβ3v bezeichnet wurden (Roskopf et al., 2003). Im Gegensatz zu Gβ3v wurde für Gβ3s2 ebenfalls eine enge Assoziation zum *GNB3* 825T-Allel nachgewiesen, d.h. Gβ3s2 wird wie Gβ3s gehäuft bei Trägern des 825T-Allel gefunden. Wie bei Gβ3s fehlt auch bei Gβ3s2 das Äquivalent einer WD-Domäne, so dass strukturell Gβ3s2 wie Gβ3s nur über 6 Propellerblätter verfügt; es fehlt Gβ3s2 jedoch ein anderes Propellerblatt als Gβ3s. Unklar ist bis heute, welchen Beitrag diese beiden Gβ3-Varianten zur Entstehung des Phänotyps einer gesteigerten Signaltransduktion leisten. So ist offen, welche kurze Variante funktionell an der Entstehung der gesteigerten Signaltransduktion beteiligt ist, oder ob beide Varianten erforderlich sind.

Die Klonierungen von Gβ3s2 und Gβ3v erfolgten erst, nachdem die Experimente dieser Doktorarbeit abgeschlossen waren, so dass experimentell auf weitergehende Fragen nicht eingegangen werden konnte. Diese Arbeit beschäftigt sich daher ausschließlich mit Gβ3s und der Wildtypvariante Gβ3.

Weiter oben wurde bereits die Struktur von Gβ-Proteinen erläutert und auf die Bedeutung von WD-Domänen als strukturbildende Domänen eingegangen. Reguläre Gβ-Proteine bestehen somit aus 7 WD-Domänen, während Gβ3s nur 6 solcher Domänen besitzt. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass zahlreiche Proteine mit WD-Repeats in einer Zahl von 4 – 16 existieren (Temple et al., 1999). Ferner weiß man, dass WD-Proteine mit 6 Domänen eine kondensierte Struktur einnehmen, die für eine Faltung als Propeller spricht (Saxena et al., 1996; Garcia-Higuera et al., 1998). Dabei handelt es sich – wie bereits ausgeführt – um keine Gβ-Proteine, sondern um Proteine mit vielfältigen anderen Funktionen. Es liegt daher nahe zu

vermuten, dass G β 3s auch eine kondensierte Struktur als 6-blättriger Propeller einnimmt (Siffert et al., 1998; Iiri, Bourne, 1998).

1.2.3. Fragestellung dieser Arbeit

Wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit war die Frage, inwieweit G β 3s typische Eigenschaften von G β -Proteinen besitzt. Entscheidend für die Funktion von G β -Proteinen ist – wie bereits eingehend erläutert – ihre Fähigkeit mit G γ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden, die dann mit Rezeptoren, G α -Untereinheiten und Effektoren interagieren können. Im Einzelnen sollte daher geklärt werden, ob und mit welchen G γ -Untereinheiten G β 3s stabile Dimere bilden kann. Als Vergleich sollte das bereits gut untersuchte G β 1 dienen. Da zu dem Wildtypprotein G β 3 hierzu auch nur wenige Ergebnisse vorliegen (Schmidt et al., 1992; Thomas et al., 1993), wurde auch dieses mit in die Untersuchungen einbezogen.

Methodisch kommen zur Bearbeitung dieses Problems mehrere Techniken in Frage. Zum einen kann untersucht werden, welche G $\beta\gamma$ -Dimere spezifische Effektoren wie z.B. PLC- β Isoformen oder GRKs *in vivo* oder *in vitro* aktivieren können. So können z.B. G β - und G γ -Proteine zusammen mit PLC- β Isoformen in geeigneten Zellen überexprimiert werden und man misst vergleichend die PLC-Aktivität. Kommt es zu einer Stimulation eines Effektors, so weiß man im positiven Fall, dass das entsprechende G $\beta\gamma$ -Dimer existiert. Bleibt hingegen die Stimulation aus, so ist unklar, ob sich das entsprechende G $\beta\gamma$ -Dimer nicht gebildet hat, oder ob dieses G $\beta\gamma$ -Dimer einfach nicht in der Lage ist, den jeweiligen Effektor zu stimulieren.

In ähnlicher Weise kann man auch die Interaktion von G $\beta\gamma$ -Dimeren mit G α -Untereinheiten testen.

Bei anderen methodischen Ansätzen wird versucht, G $\beta\gamma$ -Dimere zu reinigen und dann ihre Zusammensetzung mit geeigneten Antikörpern zu analysieren. Angesichts der theoretischen Vielfalt möglicher G $\beta\gamma$ -Dimere und der Notwendigkeit im Westernblot die Proteine zu denaturieren, ist dieser Weg neben der immanenten Aufwändigkeit nicht sehr viel versprechend.

Eine andere Methode versucht, durch Anwendung des *Yeast-two-Hybrid* Systems spezifische G $\beta\gamma$ -Dimere zu identifizieren (Yan et al., 1996). Die Arbeitsgruppe um Eva Neer hat darüber hinaus ein Verfahren entwickelt, bei dem

G γ -Untereinheiten durch gerichtete Mutagenese mit einem sogenannten „HA-Tag“ versehen werden (Garcia-Higuera et.al., 1998; Panchenko et al., 1998). Dabei handelt es sich um eine kurze Peptidsequenz, die am N-Terminus des G γ -Proteins angebracht wird. Kommerzielle Antikörper erkennen diese HA-Markierung und man kann Proteine, die diese Sequenz tragen, durch Immunpräzipitation aufreinigen. In diesem System können dann G β -Proteine, die ein Dimer mit dem HA-G γ -Protein bilden, nach Immunpräzipitation durch einen weiteren Westernblot identifiziert werden (so genannte Ko-Präzipitation).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode verwendet, die ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Eva Neer entwickelt und bereits häufig beschrieben wurde: den Schutz stabiler G $\beta\gamma$ -Dimere vor tryptischem Verdau. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, eine so genannte Serinproteinase. Es ist das Hauptenzym zur enteralen Eiweißverdauung und wird vom exokrinen Pankreas als Vorstufe gebildet. Es spaltet bei pH 7-8 Peptidbindungen, an denen Lysin oder Arginingruppen beteiligt sind. G β -Proteine besitzen zahlreiche solcher Sequenzmotive, an denen Trypsin die Aminosäurekette spalten kann. Man weiß aus zahlreichen Untersuchungen, die überwiegend an G β 1 vorgenommen wurden (Schmidt, Neer 1991; Schmidt et al., 1992), dass nach ordnungsgemäßer Faltung und Dimerisierung fast alle Erkennungsstellen für Trypsin im Inneren des G β -Proteins zu liegen kommen, d.h. für ein Angriff durch Trypsin nicht mehr zugänglich sind. Nur noch eine einzige Stelle in der Sequenz von G β 1 kann gespalten werden, so dass nach Bildung des G $\beta\gamma$ -Dimers nicht mehr viele Kleinstfragmente entstehen, sondern man beobachtet, dass aus dem 36 kDa großen G β -Proteine zwei Fragmente von 27 kDa (C-terminal) und 14 kDa (N-Terminal) entstehen (Schmidt et al., 1992; Thomas et al., 1993; Ray et al., 1995). Diese Fragmente können z.B. nach radioaktiver Markierung durch Autoradiographie oder im Westernblot visualisiert werden. Kann man ein 27 kDa Fragment nachweisen, so ist dies ein Hinweis dafür, dass es zur funktionellen Dimerisierung von G β - und G γ - Untereinheiten gekommen ist. Die zu analysierenden Proteine können durch *in vitro*-Translation in Anwesenheit radioaktiv markierter Aminosäuren gewonnen werden (Schmidt et al., 1992). Alternativ können auch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten in COS7- oder Sf9-Zellen überexprimiert und die entsprechenden Proteinfragmente nach Trypsinbehandlung im Westernblot analysiert werden.

Diese Methode hat sich – wie erwähnt – bereits zur Analyse von G β 1 γ - und G β 2 γ -Dimeren bewährt (Neer et al., 1994; Robishaw et al., 1995). Aufgrund der hohen strukturellen Homologie zwischen G β 1, G β 2, G β 3 und G β 4 liegt es nahe, diese Methode auch an G β 3 und in unserem Fall an G β 3s anzuwenden. Während in der Arbeitsgruppe von E. Neer die Synthese der G $\beta\gamma$ -Dimere durch *in vitro* Translation erfolgte, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich das Verfahren auch auf G β -Proteine aus Sf9-Zellen anwenden lässt.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose (Ultrapure)	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin, bovin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Adenosin 5'-(β,γ -imino)triphosphat	Boehringer, Mannheim
ATP,Na-Salz	Serva, Heidelberg
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
DL Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	Merck, Darmstadt
EDTA, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Endoproteinase Arg-C	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
MAS 7	Biomol, Hamburg
Methanol	Merck, Darmstadt
m-Kresolviolett	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Apotheke Universitätsklinikum
NaCl	Merck, Darmstadt
PBS-Puffer, pH 7,2	Apotheke Universitätsklinikum
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Polyklonales anti-Kanninchen Ig-G	Sigma, Deisenhofen

Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Serva-Blau G-250 Tabletten	Serva, Heidelberg
SDS reinst	Roth, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
Szintillatorflüssigkeit Instant Szint	Packard, USA
Gel II Plus	
Guanosin-5'-diphosphat (GDP)	Boehringer
Temed	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Triethanolamin-HCl (TEA)	Merck, Darmstadt
Tricine	Sigma, Deisenhofen
TRIS-hydroxymethylaminomethane	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Boehringer, Mannheim
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm

2.2. Fertige Lösungen und Kits

BCA Proteinbestimmungskit	Pierce, Rockford, USA
B+W Fixierer und Entwickler (Neutol®)	AGFA, Leverkusen
ECL Reagents	Amersham, Göttingen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Szintillatorflüssigkeit Instant Szint	Packard, USA
Rotiphorese® 40%	Roth, Karlsruhe
(Acrylamid-Bisacrylamid Stammlösung 29:1; 40% (v/v))	

2.3. Radiochemikalien

[γ ^{35}S] Guanosin-5'-(γ -thio)triphosphat (aliquotiert a' 0,1 μCi ; Lagerung bei – 20° C)
der Firma NEN.

2.4. Antikörper

Zum Nachweis von G β -Proteinen wurde der Antikörper Anti-G β_{common} (T-20; sc-378) von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA verwendet. Er erkennt ein in G β 1, G β 2, G β 3 und G β 4 konserviertes C-terminales Epitop von 20 Aminosäuren. Es handelt sich um ein polyklonales Serum vom Kaninchen und wird in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ geliefert.

Zum spezifischen Nachweis von G β 1 kam der Antikörper Anti-G β 1 von Santa Cruz Biotechnology (C-16; sc-379) zur Anwendung. Er erkennt ein Peptid epitop aus dem N-Terminus von G β 1 und reagiert nicht mit den anderen G β -Untereinheiten. Auch hier handelt es sich um ein polyklonales Serum vom Kaninchen.

Ebenfalls ein polyklonales Antiserum vom Kaninchen ist der subgruppenspezifische G β 2-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (C-16; sc-380). Auch hier wird ein spezifisches Peptid epitop aus dem N-Terminus von G β 2 nachgewiesen.

2.5. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Insect Medium TC –100	Sigma
fötales Rinderserum (FBS)	Sigma
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)	Gibco BRL

Das Insect Medium TC-100 wurde als steriles Medium von der Firma Sigma gebrauchsfertig bezogen. FBS und Antibiotika wurden erst unmittelbar vor der Verwendung des Mediums in einer Konzentration von 10% (v/v; FBS) bzw. 1% (v/v; Penicillin / Streptomycin) zugesetzt. Das Komplettmedium wurde anschließend durch einen 0,2 μm -Filter sterilfiltriert. Für Transfektionen wurde reines TC-100-Medium ohne FBS- und Antibiotikazusatz verwendet.

2.6. Sonstige Materialien

Nitrozellulose (0,2 µm)	Schleicher und Schuell
Protein Molekulargewichtsmarker	BioRad Laboratories
Röntgenfilm X-AR	Kodak
PROTAN 0,45	Schleicher und Schuell, Dassel

2.7. Lösungen für die Präparation von Plasmamembranen

PMSF-Stammlösung 100mM:

PMSF	871 mg
Isopropanol	50 ml

Lysepuffer:

Saccharose	250 mM
Tris	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
ATP	1 mM
Benzamidin	1,5 mM
Trypsin Inhibitor	2µg/µl
PMSF	1mM
Auf pH 7,5 mit HCl einstellen.	

Waschpuffer:

Tris	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1mM
Benzamidin	3 mM
Trypsin Hemmstoff	2 µg/µl
PMSF	1 mM

Die Inhibitoren Benzamidin, Trypsinhemmstoff und DTT wurden erst kurz vor Gebrauch frisch dazugegeben. Ebenso das ATP.

2.8. Lösungen für die tryptische Spaltung von Proteinen

Inkubationspuffer für die Trypsinspaltung (nach E. Neer):

Tris	50 mM
MgCl ₂	6 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

Auf pH 8,0 mit HCl einstellen.

Inkubationspuffer für die Proteinase Arg-C:

Tris	100 mM
CaCl ₂	6 mM

Auf pH 7,6 mit HCl einstellen.

2.9. Lösungen und Puffer für die SDS-Gelelektrophorese

SDS-Probenpuffer nach Laemmli (3fach)

SDS 20%	30 % v/v
Glycerol	30 % v/v
Tris 1M, pH 6,8	18 % v/v
H ₂ O	22 % v/v
β-Mercaptoethanol	
+Farbstoff Bromphenolblau	
oder m-Kresol Violett, jeweils	1 Spatelspitze

Trenngelpuffer (8-fach):

Tris	3 M
------	-----

Mit HCl auf pH 8,8 einstellen.

Sammelgelpuffer:

Tris	0,5 M
------	-------

Mit HCl auf pH 6,8 einstellen

Laufpuffer:

Tris	20 mM
Glyzin	190 mM
SDS	30mM

Anodenpuffer (für das 15% Gel)

Tris	25 mM
Glyzin	192 mM
Natriumacetat	100 mM

Verschlussgelmischung: (für 2 Gele)

Trenngelpuffer	3 ml
Acrylamid 40%	3 ml
APS 10%	30 µl
TEMED	30 µl

Trenngelmischung 8%: (für 2 Gele)

Acrylamid 40%	4 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
H ₂ O	13,22 ml
SDS 10%	200 µl
APS 10%	70 µl
TEMED	7 µl

Trenngelmischung 20%: (für 2 Gele)

Acrylamid 40%	10 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
H ₂ O	7,22 ml
Saccharose	3,0 g
SDS 10%	200 µl
APS 10%	70 µl
TEMED	7 µl

Trenngelmischung 15%: (für 2 Gele)

Acrylamid 40%	15 ml
Trenngelpuffer	5 ml
H ₂ O	19,4 ml
SDS 10%	400 µl
APS 10%	120 µl
TEMED	14 µl

Sammelgelmischung: (für 2 Gele)

Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid 40 %	2,55 ml
H ₂ O	14,5ml
SDS 10%	200µl
APS 10%	200µl
TEMED	20µl

2.10. Lösungen für den Elektrottransfer**Transferpuffer:**

Tris	2,7 M
Glyzin	0,2 M
Methanol	20 % (v/v)

2.11. Lösungen für die Westernblotanalyse**TBS-Lösung: (Tris-buffered Saline)**

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Auf pH 8,0 mit HCl einstellen.	

TBS+Tween20:

0,05 % ige Lösung von Tween20 in TBS

Blocklösung:

5 % ige Lösung von Magermilchpulver in TBS/Tween20

Antikörpervedünnungslösung:

1 % ige Lösung von Albumin Fraktion V in TBS

Ponceau S Stammlösung:

Ponceau S	1 g
Trichloressigsäure	15 g
Sulfosalicylsäure	15 g
H ₂ O	50 ml

Ponceau S Gebrauchslösung:

Ponceau S Stammlösung 1:10 mit H₂O verdünnen.

2.12. Lösungen für den GTP γ S- Bindungsassay

Reaktionspuffer:

NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	5 mM
TEA pH 7,4	50 mM

Permeabilisierungspuffer:

NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	5 mM
Digitonin	100 μ M
GDP	100 mM
TEA pH 7,4	50 mM
AppNHp	100 μ M

[³⁵S]GTP γ S-Verdünnung:

³⁵ S-GTP γ S 10 μ M	10 μ l
-------------------------------------------	------------

DTT 100 μ M	100 μ l
Tricine 100 μ M	100 μ l
H ₂ O	ad 1000 μ l

Waschpuffer:

MgCl ₂	5 mM
Tris-Cl pH 7,5	50 mM

Stopplösung:

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
MgCl ₂	5 mM

MAS-7 Lösung: 1mg in 1,407 ml H₂O lösen (500 μ M)

2.13. Lösung für die Coomassie Färbung

Färbelösung:

Methanol	100ml
Eisessig	25ml
H ₂ O	125ml
Serva-Blau G-250	4 Tabletten

3. Methoden

3.1. Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen

3.1.1. Einführung in das System

Das Baculovirus / Sf9-Zellsystem wurde in den letzten Jahren vermehrt verwendet, um rekombinante Proteine in großer Menge herzustellen. Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen werden posttranslationale Modifikationen, wie sie typischerweise in Eukaryonten vorkommen, auch von Sf9-Zellen ordnungsgemäß durchgeführt. Neben der großen Expressionsrate ist als weiterer Vorteil dieses Systems die Ungefährlichkeit der verwendeten Viren für die Umwelt anzuführen.

Bei Sf9-Zellen handelt es sich dabei um Zellen aus Ovarialgewebe von *Spodoptera frugiperda* Larven. Die Linie wurde 1983 von Gale E. Smith und Carol L. Cherry aus der Linie IPLB-Sf21 AE weiterentwickelt, die aus Ovarialgewebe von Puppen des *Fall army worm* (= *Spodoptera frugiperda*) abstammen.

Die Linie Sf9 ist besonders anfällig für das *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV), welches zur Gruppe der Baculoviren gehört. Der Name bezieht sich auf das stäbchenförmige Aussehen dieser Virenfamilie im Elektronenmikroskop. Diese Virenfamilie besitzt eine doppelsträngige zirkuläre DNA, die in der Größe von 80 - 200 kbp variiert. Das AcNPV selbst ist in der Wildtypform 135 kbp groß. Es befällt nur eine kleine Gruppe von Insekten und kann nicht auf den Menschen oder Säugetiere übertragen werden.

Die Insektenzelle gibt bei Infektion mit dem Wildtypvirus zwei Formen des Virus ab: in der frühen Phase, ca. 10 h nach Infektion, werden *extracellular virus particles* durch Abschnürung freigesetzt. Sie umfassen ein einzelnes Virus, das keine Polyhedrinhülle besitzt. Diese Virusart eignet sich nur zur Infektion benachbarter Zellen, da ein Überleben an der Umwelt nicht möglich ist. Während der späten Phase des Infektionszyklus, ca. 3 Tage nach Infektion, werden *occluded virus particles* im Zellkern infizierter Zellen hergestellt. Diese bestehen aus mehreren Viren, die in eine feste Polyhedrinhülle eingebettet sind. Das Maximum wird nach 5-6 Tagen erreicht. Das Polyhedrin schützt die Viren z.B. vor Austrocknung, ist aber selbst nicht für die

Infektion von Insektenzellen notwendig. Außerdem schützt die kristalline Polyhedrinhülle das Virus im Gastrointestinaltrakt infizierter Wirtslarven vor der Verdauung.

Dies macht man sich zunutze, indem man die genetische Information für Polyhedrin entfernt und an diese Stelle die Information für das Zielprotein (z.B. G-Protein) einfügt: man erhält ein rekombinantes Baculovirus. Damit verlieren diese Viren ihre Infektionsfähigkeit für Insekten, da eine unbeschadete Passage des Gastrointestinaltraktes nicht mehr möglich ist.

Aus der Biologie des Baculovirus geht hervor, dass die rekombinanten Proteine unter Kontrolle des Polyhedrinpromotors in der späten Phase des Infektionszyklus gebildet werden. Nach Infektion der Sf9-Zellen stellen diese die Produktion endogener Proteine zugunsten der durch das Baculovirus kodierten Proteine fast vollständig ein. Sf9-Zellen können auch große Proteine >100kDa problemlos herstellen, Introne werden gespleißt und Signalpeptide abgetrennt. Außerdem ist die gleichzeitige Infektion mit mehreren Viren möglich, und somit die Herstellung von Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind.

Für die Herstellung rekombinanter Proteine mit dem Baculovirussystem ist eine ausreichend hohe Baculoviruskonzentration entscheidend. Ziel ist, dass mindestens jede Sf9-Zelle von einem Baculovirus infiziert wird. In der Praxis werden daher Viruskonzentrationen (*multiplicity of infection*) verwendet, die von 2 – 3 Viren pro zu infizierender Zelle ausgehen.

Die für diese Arbeit verwendeten rekombinanten Viren wurden mir von Herrn Dr. Stefan Busch und Herrn Dr. Dieter Roskopf – Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen – zur Verfügung gestellt. Im Speziellen waren die Viren für G β 3 und G β 3s mit Hilfe des „Bac-to-Bac®“ Systems von Life Technologies hergestellt worden. Hierbei kommt es durch Transposition zur Integration der Ziel cDNA in den Kontext des Polyhedrinpromotors.

Unter Transposition versteht man einen Mechanismus, bei dem aus einer DNA an einer bestimmten Stelle ein Abschnitt ausgeschnitten und an anderer Stelle wieder eingebaut wird. Solche Vorgänge kommen zum Beispiel bei „springenden Genen“ vor. In dem vorliegenden Fall wurde das Zielgen in den pFastBac Vektor kloniert. Mit dem pFastBac Vektor wurden kompetente *E. coli* Bakterien transformiert, die ein großes Plasmid (Bacmid) enthalten. Gleichzeitig findet in diesen Zellen die Transposition statt. Das Zielgen wird aus dem pFastBac Vektor ausgeschnitten und

in das Bacmid an genau definierter Stelle transferiert. Das Bacmid ist die Sequenz des Baculovirus, in die somit das Zielgen eingefügt wird. Aus diesen Bakterien gewinnt man dann das rekombinante Bacmid und transfiziert Sf9-Zellen. Diese generieren aus der Information des Bacmids infektiöse Baculoviren, die dann entsprechend weiter vermehrt werden können.

3.1.2. Kultur von Sf9-Insektenzellen

Die Sf9-Zellen wurden in einem Inkubator bei Raumluft und einer Temperatur von 26 – 28° C bebrütet. Eine Begasung mit CO₂ ist für diese Zellen nicht erforderlich, aufgrund der schnellen Proliferationsgeschwindigkeit ist aber auf eine ausreichende Belüftung mit O₂ zu achten.

Alle hier geschilderten Arbeitsgänge wurden in einer Reinraumwerkbank unter Beachtung der üblichen Steriltechnik durchgeführt.

Routinemäßig kultivierten wir die Zellen in TC-100 Insektenmedium (Sigma, Deisenhofen), das mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) und 100 µg/ml Streptomycin sowie 100 U/ml Penicillin supplementiert wurde. Vor allen Manipulationen an den Zellen erfolgte eine mikroskopische Kontrolle auf mögliche Kontaminationen der Zellen und die Abschätzung des Konfluenzgrades.

Sf9-Zellen bilden einen adhärenenten Monolayer aus, in einer dicht bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche befanden sich etwa 1.7×10^7 Sf9-Zellen. Altes Medium wurde von den konfluenten Zellen mit einer sterilen Pipette bis auf etwa 5 ml abgesaugt und mit diesem verbliebenen Medium wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgespült. Die Zellen wurden dann auf 2 – 3 neue 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und mit 20 ml Vollmedium aufgefüllt. Dabei wurde das Medium routinemäßig mit einem 0.2 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert.

Die Zellen wurden jeweils nach Erreichen der Konfluenz passagiert, was etwa alle 2 – 3 Tage erforderlich war.

3.1.3. Nachamplifikation von Baculoviren

Unter der Nachamplifikation von Baculoviren versteht man die Vermehrung von Baculoviren in Sf9-Zellen um einen Virusstammlösung für weitere Infektionen herzustellen. Im Gegensatz zu der Herstellung rekombinanter Proteine, die etwa 48 h

nach Infektion ihr zeitliches Optimum im Hinblick auf funktionelle Proteine aufweist, wurden die höchsten Virustiter etwa 4 – 5 Tage nach der Infektion erzielt.

Für die hier beschriebenen Versuche wurden jeweils sehr hohe Virustiter von $> 10^7$ /ml angestrebt. Im Gegensatz zur Infektion von Sf9-Zellen zur Herstellung rekombinanter Proteine, bei der mit einer hohen Viruszahl infiziert wurde (*Multiplicity of Infection* = MOI $> 2 - 3$), erfolgte die Infektion zur Nachamplifikation mit einer niedrigen MOI. Mit der Zeit können durch Mutationen defekte Viren entstehen, deren DNA nur im Falle gleichzeitiger Infektion von Sf9-Zellen mit intakten Viren weitergegeben werden kann (sog. Helfervirus Prinzip). Durch Animpfen mit niedriger MOI wurde somit die Amplifikation voll vermehrungsfähiger Viren begünstigt.

In praxi wurde eine dicht bewachsene Zellkulturflasche ($\sim 1,7 \times 10^7$ Zellen) mit 100 μ l der Virussuspension in 10 ml Vollmedium beimpft. Da durch Nachamplifikationen der Titer an rekombinanten Viren sinkt, wurde immer aus einer Ursprungsverdünnung nachamplifiziert. Die Virusproduktion erreicht nach 5-6 Tagen ihr Maximum, daher erfolgte die „Ernte“ am 5.Tag nach der Infektion. Der Zellkulturüberstand wurde abgesaugt, in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen überführt und bei $10.000 \times g$ 10 min lang bei 4°C, zentrifugiert. Das Pellet, das Sf9-Zellen und Zelldebris enthält, wurde verworfen. Die so erhaltene Virussuspension wurde als Gebrauchslösung bei 4° C im Dunkeln gelagert.

3.1.4. Infektion von Sf9-Zellen für die Herstellung rekombinanter Proteine

Hierzu wurde eine Zellkulturflasche mit $\sim 1,7 \times 10^7$ Zellen mit den entsprechenden Baculoviren infiziert. Das alte Insektenmedium wurde mit einer sterilen Pipette abgesaugt und 10 ml neues Vollmedium steril zugegeben. Aus Sicherheitsgründen wurde dabei das Medium vor der Zugabe nochmals sterilfiltriert. Für jedes rekombinante Virus wurden dabei $\sim 300 \mu$ l der Virussuspension zu den $1,7 \times 10^7$ Zellen pipettiert. Bei einem durchschnittlichen Virustiter von 1×10^8 /ml entspricht dies einer MOI von ~ 2 .

Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit dem Medium und einer sterilen Transferpipette abgespült und in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt. Durch Zentrifugation ($5000 \times g$, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und für die entsprechenden Versuche weiterverwendet.

3.1.5. Präparation von Plasmamembranen

Zur Präparation von Plasmamembranen wurden die Zellen in 20 – 25 ml Lysepuffer in einem 50 ml Plastikröhrchen resuspendiert.

Der Zellaufschluss erfolgte durch Stickstoffkavitation in einer entsprechenden Vorrichtung. Hierbei wurden die Zellen etwa 20 min bei 4 °C unter Rühren (Verwendung eines Magnetrührers) einer Atmosphäre von 60 bar N₂ ausgesetzt. Der Stickstoff geht unter diesen Bedingungen in Lösung. Durch plötzliche Druckreduktion, indem die Zellsuspension über eine Kapillare abgelassen wurde, kam es zur Bildung von Gasblasen in den Zellen, die zu einer Lyse der Zellen führte. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelldebris wurden durch Zentrifugation (5000 x g, 4°C; 10 min) in einer Tischzentrifuge (Omnifuge, HERAEUS) pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde anschließend bei 20000 x g, 4°C 20 min lang in einer Sorvall Superspeed Zentrifuge zentrifugiert. Dabei pelletieren die Plasmamembranen, die in etwa 100 – 200 µl Waschpuffer resuspendiert wurden. Zur gleichmäßigen Homogenisierung wurden sie mehrfach durch eine 21G Kanüle gesaugt. Anschließend wurde die Membransuspension in 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei – 70° C.

3.1.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde mit dem *BCA Protein Assay Reagent Kit* durchgeführt.

Dazu wurden die Membranen 1:10 verdünnt (45µl H₂O und 5µl Probe). Die Arbeitsreagenzien A und B wurden 50:1 gemischt und jeweils 1ml davon zu den verdünnten Proben und zur vorbereiteten Standardreihe gegeben. Die Standardreihe enthält Proteinkonzentrationen von 1500, 1000, 750, 500, 250 und 125 µg/µl. Die Leermessung im Photometer wurde nur mit Arbeitsreagenz durchgeführt, welche genau wie die anderen Proben und die Standardreihe bei 30°C 30 min lang im Wärmeschrank inkubiert wurde.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Messung im Ultrospec II-Spektralphotometer der Firma Pharmacia, Freiburg, bei einer Wellenlänge von 562 nm durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Computerprogramm „Graph Pad

Prism“ (Graph Pad Software, San Diego, Ca) ausgewertet. Dabei wird durch lineare Regression eine Ausgleichsgerade aus den Standards erstellt (Optische Dichte (OD) versus Proteinkonzentration).

3.2. Tryptische Spaltung und Nachweis der Proteine im Westernblot

3.2.1. Spaltung mit Trypsin

Es wurde hochreines lyophilisiertes Trypsin aus Rinderpankreas (BOEHRINGER, Mannheim) benutzt. Die empfohlene Trypsinmenge von BOEHRINGER beträgt 1/100 bis 1/20 der Proteinmenge. Da jeweils 50 µg Membranprotein benutzt wurde, wurden 25 µg Trypsin in 1 mM HCl gelöst und pro Ansatz 5 µl verwendet. Die Ansätze sahen folgendermaßen aus:

5 µl Trypsin

45 µl Inkubationspuffer nach Neer, welcher 50 µg Membranen enthält

Die Reaktionszeit betrug 2-3 h bei 30°C. Zur Kontrolle wurde zu jedem Ansatz ein Ansatz ohne Trypsin mitverarbeitet. Statt 5 µl Trypsin wurde nur 1 mM HCl dazugegeben.

Nach erfolgter Spaltung wurden sämtliche Proben mit 25 µl 3fach Probenpuffer nach Laemmli versetzt und 5 min bei 95°C gekocht.

3.2.2. Spaltung mit Proteinase Arg-C

5 µg der Proteinase Arg-C wurden in 50 µl H₂O gelöst. Die Aktivierungslösung, welche von Boehringer mitgeliefert wird, wurde in 100 µl H₂O gelöst. Folgender Inkubationspuffer wurde hier verwendet:

Tris 100 mM

CaCl₂ 10 mM

pH 7,6

Die empfohlene Enzymmenge betrug hier 1/200-1/50 der Proteinmenge. Die Ansätze sahen folgendermaßen aus:

5 µl Proteinase Arg-C

85 µl Inkubationspuffer welcher 50 µg Membranen enthält

10 µl Aktivierungslösung

Wieder wurde zu jedem Ansatz eine Kontrolle ohne Enzym mitgeführt, um im Westernblot die Spaltung zu kontrollieren. Die Reaktionszeit betrug 8-15 h bei 37°C.

Danach wurden sämtliche Proben mit 3fach Laemmli versetzt, so dass das Laemmli einfach konzentriert vorlag, anschließend wurde bei 95°C 5min gekocht.

3.2.3.Kontrolle der enzymatischen Spaltung im Westernblot

Beim Westernblot handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine zuerst elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden und danach auf einen Trägerfilter, hier Nitrozellulose, übertragen werden (Elektrotransfer).

Die Proteine können nach dem Transfer mit Antikörpern behandelt werden, um so einzelne Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und der spezifischen Anfärbungen mit Antikörpern, zu identifizieren. Für die Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht wurden SDS-Gele verwendet. Proteine binden proportional zu ihrer Größe SDS-Moleküle und erhalten dadurch eine negative Ladung. Bei konstantem Verhältnis von negativer Ladung zum Molekulargewicht wirkt sich auf alle Proteine das gleiche elektrische Feld aus und es resultiert eine Auftrennung der Proteine nur aufgrund der Interaktion mit den Poren des Gelsystems. Kleinere Proteine können sich daher bei gegebener Zeit im SDS-Polyacrylamidgel weiter bewegen als große Proteine. Zur Identifizierung der Proteine wurden Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen. Diese bestehen aus Proteingemischen bekannten Molekulargewichts. Die Elektrophorese erfolgte in einer Anlage der Firma Pharmacia/LKB, USA (Modell 2001).

3.2.4.Elektrophorese

Um die Proteine der Größe nach aufzutrennen und darzustellen wurden sie in einem 8-20%igen Gradientengel aufgetrennt.

Dazu wurden eine 8 % ige und eine 20% ige Acrylamidgellösung angesetzt. Für ein Gradientengel wurden 20ml 8%ige Acrylamidlösung und 20ml 20%ige Acrylamidlösung benötigt. Zum Start der Polymerisation wurden APS 10% und TEMED zugegeben. Als Gießform dienten zwei Glasscheiben in einer Halterung, die zuvor mit einem Verschlussgel unten abgedichtet wurden. Die beiden Acrylamidlösungen wurden nach Zugabe der Starter APS und TEMED mithilfe einer Mischkammer vorsichtig zwischen die Glasscheiben gegeben. Die Kammern wurden so beschickt, dass ein Trenngel mit höherprozentiger Acrylamidlösung unten und

niedriger Acrylamidlösung oben entstand. Bis zum Aushärten wurde oben mit H₂O-gesättigtem Isobutanol abgedichtet. Zum Auftragen der Proben wurde ein Sammelgel hergestellt. Die Starter APS und TEMED wurden wieder erst kurz vor Gebrauch zugegeben. Das Isobutanol wurde von den Gelen mit Filterpapier abgesaugt und die Sammelgellösung mit einer Pipette daraufgegeben. Mit Hilfe eines Kunststoffkammes, der in das noch nicht ausgehärtete Sammelgel eingesteckt wurde, wurden die Auftragstaschen für die Proben ausgespart. Nach Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Gele in den Glasscheiben wurden aus der Gießhalterung genommen und in die Laufkammer eingebracht.

Diese wurde mit Reservoirpuffer gefüllt und an eine Stromquelle bei zunächst 50 V angeschlossen, bis die Farbstofffront in das Trenngel eingelaufen war. Dadurch wurde eine Konzentrierung der Proteine zwischen Leit- und Folgeionenfront ermöglicht. (Chrambach et al., 1971) Anschließend wurde die Spannung unter ständiger Kühlung des Puffers bis auf 300 V erhöht. Wenn die Bromphenolblaufront (welches dem Laemmli zugesetzt war) das Verschlussgel erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen.

3.2.5. Elektrotransfer

Die Gele wurden aus der Elektrophoresekammer entfernt, das Verschluss- und Sammelgel wurden abgeschnitten, und die Gele in Transferpuffer äquilibriert. Zwei Sandwichhalterungen (Sandwich-Transfer-Apperatur Fa. Bio-Rad) wurden in folgender Reihenfolge beladen: Schwamm, 2 Whatmanfilter (11x14cm, Absorbent Protector Sheets, Polythene Backed), Gel, Nitrocellulosemembranen (11x14cm), 2 Whatmanfilter, Schwamm. Die Sandwichhalter wurden in die Blotkammer gestellt und diese mit Transferpuffer aufgefüllt. Bei etwa 0,7 A unter Kühlung auf 8°C wurde 1,5 h geblottet. Danach wurden die Nitrozellulosemembranen in PonceauS Farbe gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Eine Kopie wurde angefertigt und die Banden und Marker beschriftet.

Entfärbt wurde in PBS -Puffer. Bis zum immunologischen Nachweis wurden die Nitrozellulosemembranen bei -20°C eingefroren.

3.2.6. Immunologischer Nachweis

Diese Arbeiten erfolgten zur gleichmäßigeren Benetzung der Membranen auf einem Schüttler.

Die Membranen wurden zurechtgeschnitten und in der Blocklösung 1h inkubiert. Dabei werden unspezifische Bindungsstellen durch das Protein in der Lösung abgesättigt. Nach viermaligem Waschen mit TBS/Tween20 wurde der erste Antikörper β -common, ein polyklonaler Kaninchenantikörper (Santa Cruz Biotechnologie Heidelberg) in einer Verdünnung 1:1000 mit Antikörperverdünnungslösung auf die Membranen gegeben und diese 1,5 h inkubiert. Darauf folgten wieder 4 Waschvorgänge mit TBS/Tween20. Der 2. Antikörper, ein Peroxidase konjugierter goat-anti-rabbit Immunglobulinantikörper von SIGMA (Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen Kaninchenimmunglobulin) wurde 1:5000 mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt und 45 Minuten auf die Nitrozellulose gegeben. Der letzte Waschvorgang bestand aus dreimaligem Waschen mit TBS/Tween20 und einmaligem Waschen mit TBS für jeweils 5 Minuten.

3.2.7. Nachweis der Chemilumineszens

Die Nitrozellulosemembranen wurden kurz getrocknet und dann je nach Größe mit 5-10 ml ECL – Lösung für 1 Minute überschichtet. Dazu wurden gleiche Volumina A und B der ECL Lösung in einem Röhrchen gemischt. Überschüssige ECL- Lösung wurde mit einem Whatman-Filter abgesaugt. Die Nitrozellulosemembranen wurden zwischen zwei Blättern Klarsichtfolie fixiert und in einer Röntgenkassette im Dunkeln mit einem Röntgenfilm (Kodak X-AR) bedeckt. In der Regel wurde die Chemilumineszens über verschiedene Zeitspannen durch Belichten von mehreren Röntgenfilmen dokumentiert, um hierdurch ein optimales Signal- / Rauschverhältnis zu erhalten. Die Filme wurden anschließend 5 min lang in Entwicklerlösung inkubiert, 3 min lang gewaschen und 5 min in Fixierlösung fixiert. Im Falle des β -common Antikörpers belief sich die Belichtungszeit auf 10-60 Sekunden.

3.3. Nachweis der Funktionalität von Gβ3 im GTP γ S-Bindungs-Assay

3.3.1. Allgemeines zum Bindungsassay

Beim GTP γ S -Bindungsassay macht man sich die Tatsache zunutze, dass eine aktivierte G-Protein- α -Untereinheit GTP bindet, solange das G-Protein aktiviert ist. Durch intrinsische GTPase Aktivität wird GTP in GDP katalysiert und der Aktivitätszustand wird beendet (siehe Kapitel 1.1.3.). Gibt man nun in einer bestimmten Zellanzahl eine definierte Menge an radioaktiv markierten GTP dazu ([35 S]GTP γ S) und stimuliert die Zellen mit einem Agonisten, so kann man in einem Counter das gebundene radioaktive GTP γ S messen und so einen relativen Aktivierungsgrad der Zellen bestimmen. Voraussetzung ist allerdings, dass der Reaktionszyklus der G-Proteine abgestoppt und überflüssiges radioaktives GTP γ S entfernt wird. Außerdem ist es notwendig, die Zellen zu permeabilisieren um ein Eindringen des radioaktiven GTP γ S zu ermöglichen.

Auch in diesem Versuch wurden mit dem Baculovirus infizierte Sf9-Zellen verwendet. Es wurden Sf9-Zellen mit jeweils einer Gβ3-Untereinheit zusammen mit einer G α - und G γ -Untereinheit infiziert (siehe Kapitel 3.1.).

Da mit Mastoparan-7 stimuliert wurde, konnte auf die Expression eines Rezeptors verzichtet werden. MAS-7 ist ein besonders effizient stimulierendes Peptid für Proteine der Gai-Familie (Tsutomu et al., 1990).

3.3.2. Durchführung

Die infizierten Sf9-Zellen wurden nach 2 Tagen von den Zellkulturflaschen mit PBS-Puffer abgespült und 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Medium und der PBS-Puffer im Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in kaltem Stammpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden im Casy-Counter gezählt und alle Ansätze eines Versuches wurden auf dieselbe Zellzahl eingestellt (ca. 3×10^6 Zellen/ml und Zelllinie). Gemessen wurde die [35 S]GTP γ S-Bindung nach 10 min Reaktionszeit. Zur besseren Auswertung wurden von jeder Zelllinie Dreifachbestimmungen durchgeführt. In jedes Reaktionsröhrchen wurden 120 μ l Permeabilisierungslösung vorgelegt und 10 min

im Wasserbad auf 30°C erwärmt. Danach wurden zu jedem Röhrchen 40µl Zellsuspension zugegeben, so dass etwa 500.000 bis 1×10^6 Zellen pro Röhrchen vorhanden waren. Nun wurden die Zellen für 15 min permeabilisiert, was durch das Digitonin in der Permeabilisierungslösung erfolgte. Dadurch gelingt [^{35}S]GTP γ S und Mastoparan-7 der Zugang ins Zellinnere. Nach dieser Zeit stimulierte man die Zellen mit 20µl einer Mastoparan-7-Lösung, welche direkt als Agonist die G-Proteine stimuliert. Für die Bestimmung der basalen Bindung wurden anstatt eines Agonisten 20 µl Wasser zugesetzt. Die unspezifische [^{35}S]GTP γ S-Bindung wurde definiert als diejenige Fraktion des gebundenen [^{35}S]GTP γ S, die nicht durch 10 µM unmarkiertes GTP γ S verdrängt werden kann. Hierzu zählen im wesentlichen die Bindung an andere Proteine oder auch die Bindung an die Wand der Plastikröhrchen etc.. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden an Stelle des Agonisten jeweils 20 µl aus einer 10 µmol/l Lösung nicht radioaktives GTP γ S zugegeben. Der Wert der unspezifischen Bindung wurde von den Werten der basalen und stimulierten Bindung subtrahiert. Die Differenz der Bindung nach Agonistengabe bzw. Zugabe von Wasser wurde als stimulierte Bindung bezeichnet. Sie wurde z.T. als Prozentwert der basalen Bindung dargestellt.

Nach 1 min wurden 20 µl radioaktive Lösung hinzugegeben und 10 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion abgestoppt indem man 4ml Stopplösung in das Röhrchen gab und den gesamten Inhalt über einen Nitrozellulosefilter entleerte. Es wurde noch mal mit 10-12 ml Stopplösung nachgespült. Die so erhaltenen Zellen auf dem Nitrozellulosefilter wurden in ein Szintillationsröhrchen überführt in dem sich 4 ml Szintillatorflüssigkeit befand. Nun wurden die Röhrchen für mindestens 30 min in einen Überkopfschüttler gestellt, bis sich die Nitrozellulosefilter aufgelöst hatten. Die Röhrchen wurden in den Counter gestellt und die Counts per minute (cpm) alle 10 min gemessen. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Gezeigt werden – wenn nicht anders vermerkt – jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. Alle Ergebnisse wurden in mindestens 3 unabhängigen Experimenten gewonnen.

4. Ergebnisse

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, sollte im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, inwieweit die G β 3 Variante G β 3s in der Lage ist, mit G γ -Untereinheiten stabile Dimere zu bilden. Dazu diente eine Methode, die sich den Schutz der G β -Proteine vor tryptischer Spaltung nach erfolgreicher Dimerisierung in Anwesenheit von G γ -Untereinheiten zu Nutze macht. Primär wurde diese Methode mit *in vitro* translatierten Proteinen entwickelt (Schmidt, Neer 1991; Schmidt et al., 1992). In dieser Arbeit werden G-Proteinuntereinheiten verwendet, die in Sf9-Zellen unter Verwendung rekombinanter Baculoviren exprimiert werden. In einem ersten Versuchsteil wurde daher überprüft, ob die Baculoviren in der Lage sind, die entsprechenden G-Proteinuntereinheiten zu exprimieren.

4.1. Expression von G β - und G γ -Proteinen in Sf9-Zellen

Im Falle der G β -Proteinuntereinheiten G β 1, G β 2, G β 3 und G β 3s erfolgte der Nachweis einer erfolgreichen Expression in Sf9-Zellen nach Baculovirusinfektion mit Hilfe von Westernblot-Untersuchungen. Da wir nicht über Antikörper gegen alle G γ -Untereinheiten verfügten, erfolgte der Nachweis von G γ -Proteinen z.T. nach Überexpression in mit Coomassie gefärbten Proteingelen.

Sf9-Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen wurden jeweils mit rekombinanten Baculoviren infiziert (MOI ca. 2), die für die entsprechenden G-Proteinuntereinheiten kodierten. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen abgelöst, gewaschen, lysiert und krude Zellmembranen durch differentielle Zentrifugation – wie im Methodenteil beschrieben – hergestellt. Diese wurden im SDS-Gel der Größe nach fraktioniert, auf Nitrozellulose transferiert und mit geeigneten Antikörpern inkubiert, um die entsprechenden G-Proteine nach der immunologischen Färbung nachweisen zu können.

4.1.1. Expression von G β 1 und G β 2

Die G β -Untereinheiten G β 1 und G β 2 sollten bei den Trypsinierungsexperimenten als Kontrollproteine Verwendung finden, da in der Literatur eine Reihe von Ergebnissen mit diesen Proteinen bereits publiziert wurden (Schmidt et al., 1992; Thomas et al., 1993). Sf9-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren, die für G β 1 oder G β 2 kodierten, infiziert. Kontrollzellen blieben uninfiziert bzw. wurden in einigen Kontrollen mit dem „leeren“ Wildtypvirus AcNPV infiziert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Antikörpern, die spezifisch G β 1 und G β 2 erkannten. In Abb 4.1 sind repräsentative Ergebnisse dargestellt:

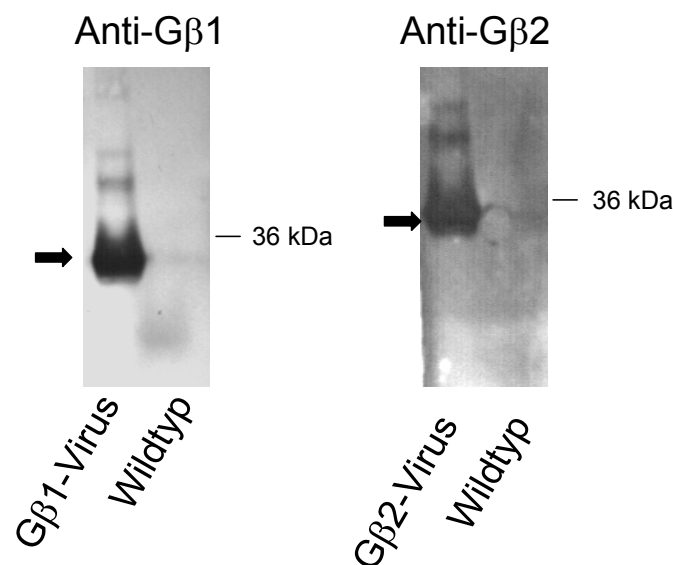


Abb. 4.1: Nachweis von rekombinanten G β 1 und G β 2 in Sf9-Zellen. Sf9-Insektenzellen wurden mit rekombinanten Viren, die G β 1 (links) oder G β 2 (rechts) kodierten, infiziert. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 2 Tagen wurden Plasmamembranen präpariert und G β 1 bzw. G β 2 mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Der Pfeil zeigt auf die erwartete Größe des jeweiligen Proteins. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

4.1.2. Expression von G β 3 und G β 3s

Da uns kein spezifischer Antikörper für G β 3 zur Verfügung stand, wurden die Untersuchungen zum Nachweis der Expression von G β 3s und G β 3 mit Hilfe eines Anti-G β_{common} Antikörpers durchgeführt. Dieser erkennt spezifisch ein konserviertes C-terminales Epitop, das identisch in G β 1, G β 2, G β 3 und G β 4 vorkommt. G β 3 und G β 3s lassen sich einfach durch ihre unterschiedliche Größe unterscheiden.

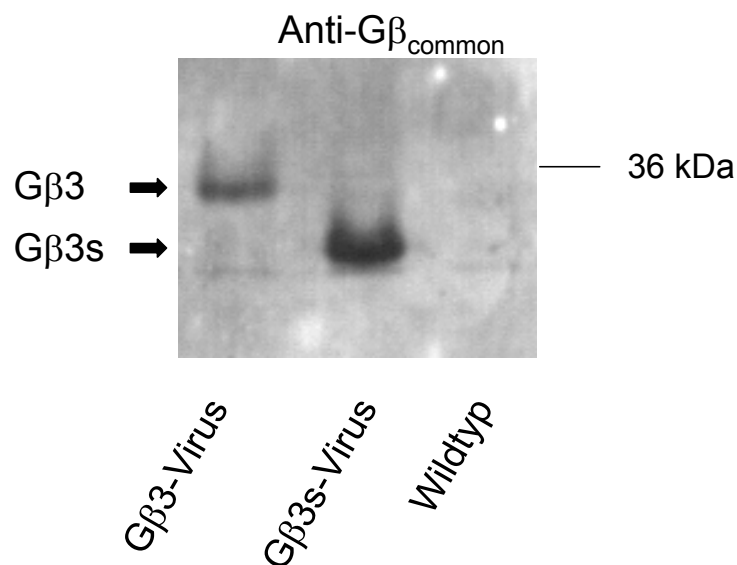


Abb. 4.2: Nachweis von rekombinanten G β 3- und G β 3s-Untereinheiten in Sf9-Zellen. Sf9-Zellen wurden mit rekombinanten G β 3- oder G β 3s-Baculoviren infiziert oder blieben unbehandelt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem Anti-G β_{common} Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier Experimenten.

4.1.3. Expression von $G\gamma$ -Untereinheiten

Im Falle der zu untersuchenden $G\gamma$ -Untereinheiten standen uns nicht für alle Isoformen geeignete Antikörper zur Verfügung, für die Isoformen $G\gamma 2$, $G\gamma 3$, $G\gamma 5$ und $G\gamma 7$ konnten jedoch entsprechende Westernblot-Untersuchungen durchgeführt werden. Aufgrund des relativ kleinen Molekulargewichts der $G\gamma$ - Untereinheiten wurde ein 15%iges Polyacrylamidgel verwendet. Da sich $G\gamma$ -Proteine erheblich in ihrer Primärstruktur unterscheiden, schwankt entsprechend auch das Laufverhalten im Gel, wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich wird.

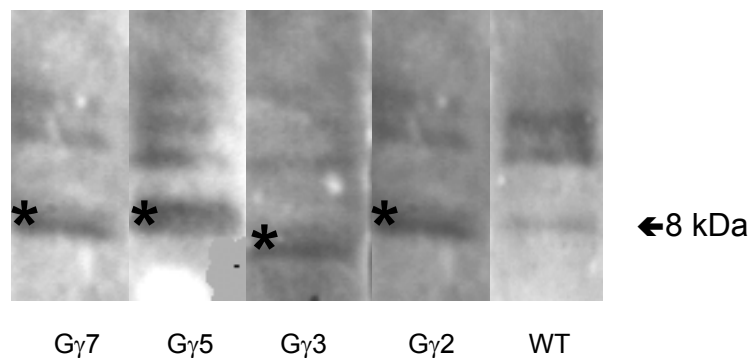


Abb. 4.3: Immunologischer Nachweis von rekombinanten $G\gamma$ -Untereinheiten in Plasmamembranen von Sf9-Zellen. Sf9-Insektenzellen wurden mit rekombinanten Baculoviren für $G\gamma 2$, $G\gamma 3$, $G\gamma 5$ oder $G\gamma 7$ infiziert. Kontrollzellen blieben uninfiziert. Nach zwei Tagen erfolgte die Präparation von Plasmamembranen, die in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert wurden. Diese Nitrocellulosemembran wurde in Streifen geschnitten und mit entsprechen Antikörpern inkubiert. Die Sterne weisen auf die Höhe der Banden, auf der die entsprechenden G-Proteinuntereinheiten erwartet werden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

Im Falle von $G\gamma$ -Untereinheiten für die kein kommerzieller Antikörper zur Verfügung stand erfolgte der Nachweis ihrer (Über-) Expression im Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie. Aufgrund der starken Expression lässt sich die neu auftretende Bande bereits in der Nativfärbung des Gels erkennen (Abb.4.4).

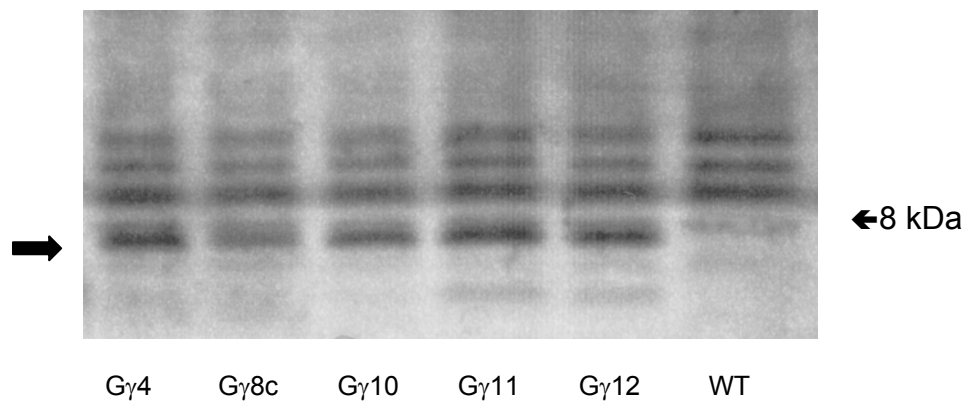


Abb. 4.4: Nachweis der Expression rekombinanter $G\gamma$ -Untereinheiten in Sf9-Insektenzellen. Sf9-Zellen wurden mit den genannten rekombinanten Baculoviren infiziert und nach 2 Tagen lysiert. Zellmembranen wurden präpariert, im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Im Vergleich zu den mit dem Wildtyp AcNP-Virus (WT) infizierten Zellen erkennt man deutlich die prominenten Banden unterhalb von 8 kDa (Pfeil). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

Zusammenfassend belegen diese Experimente, dass die von uns verwendeten rekombinanten Baculoviren in der Lage sind, die gewünschten Proteine mit hoher Effizienz (siehe $G\gamma$ -Untereinheiten nach Coomassie-Färbung) zu exprimieren.

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Proteine tatsächlich auch funktionell aktiv sind.

4.2. Funktioneller Nachweis von $G\beta 3$ und $G\beta 3s$ in Sf9- Zellen

Durch Koinfektion von Sf9-Zellen mit G $\alpha i3$, G $\beta 3s$ bzw. G $\beta 3$ und G $\gamma 5$ Untereinheiten wurden G-Protein-Heterotrimere in Sf9-Zellen exprimiert (Kapitel 3.1.4). Diese funktionsfähigen Zellen wurden dann auf ihre Stimulierbarkeit hin untersucht wie in Kapitel 3.3 ausführlich beschrieben wird. Abb.4.4 zeigt, dass die Kombinationen mit G $\beta 3$ und G $\beta 3s$ funktionell aktiv sind. Stimuliert wurde hier mit Mastoparan-7, welches direkt das G-Protein stimuliert (Tsutomu et al., 1990). Auf die Expression eines Rezeptors konnte also verzichtet werden.

Somit sind Sf9-Zellen in der Lage, funktionsfähige G-Protein-Heterotrimere zu exprimieren. Wie aus der Abbildung hervorgeht, liegt bei einer MAS-7 Konzentration von 5-15 μM der Wert der Stimulation für die G β 3s Kombination über der von G β 3.

GTP γ S-Bindung
(% der
Kontrolle)

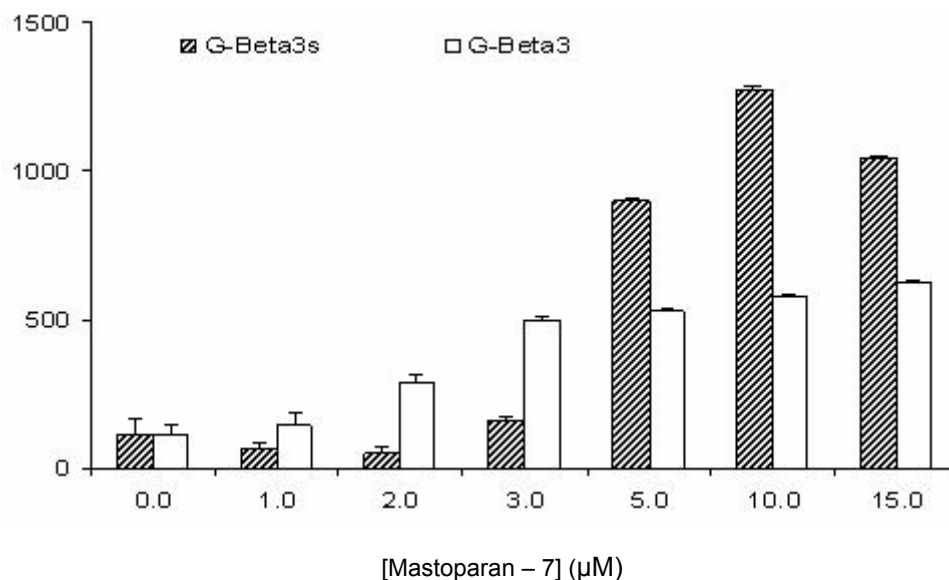


Abb. 4.5: Angegeben ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die Balken bezeichnen Mittelwerte \pm Standardfehler für Messungen, die als Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Die GTP γ S-Bindung an nicht stimulierten Zellen wurde mit 100% definiert. Sf9-Zellen, die keine rekombinanten heterotrimeren G-Proteine exprimierten erreichten maximale Stimulationen der GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von Mastoparan-7 von 150% (nicht dargestellt).

4.3. Analyse der Protektion vor tryptischer Degradation

4.3.1. Analyse von G β 1 γ - und G β 2 γ - Dimeren

Um die Rahmenbedingungen festzulegen und die Methode der Trypsinspaltung zu überprüfen, wurden im ersten Versuch Membranen verwendet, in denen G β 1, G β 1 γ 1, G β 1 γ 11 und G β 2 γ 11 exprimiert waren. Es wurden jeweils 50 μg

Membranprotein mit Trypsin gespalten und in der SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe auch 3.2.Methoden). Bei diesen Versuchen wurde $G\beta 1$ gewählt, da es mit allen bekannten $G\gamma$ -Untereinheiten trypsinresistente Dimere bilden kann (Clapham, Neer, 1997), (Schmidt et al., 1992). Andererseits hält die Kombination aus $G\beta 2$ und $G\gamma 11$ der Trypsinierung nicht stand und diente daher als Negativkontrolle. Um die Spaltung einer $G\beta$ -Untereinheit in Abwesenheit einer $G\gamma$ -Untereinheit darzustellen, wurden Sf9-Zellen nur mit $G\beta 1$ Baculoviren infiziert. Weiterhin wurde das Verhalten möglicher endogener, konstitutiv in Sf9-Zellen exprimierter G – Protein β -Untereinheiten nach Trypsinierung untersucht, indem Membranen von Sf9-Zellen verwendet wurden, die mit dem Wildtyp AcNp-Virus infiziert wurden.

Der verwendete Antikörper war der $G\beta_{\text{common}}$ -Antikörper, welcher das C-terminale Ende von $G\beta$ erkennt und so auch in der Lage ist, das 27kDa Fragment, welches nach Trypsinbehandlung eines $G\beta\gamma$ -Dimers entstehen soll, nachzuweisen. Wie in Abb. 4.6 dargestellt, erkennt der $G\beta_{\text{common}}$ -Antikörper bereits in den Membranen der mit dem AcNp-Virus infizierten Sf9-Zellen (SF 9 WT) eine schwache Bande, die möglicherweise auf endogene $G\beta$ -Proteine der Insektenzellen zurückzuführen ist und die mit dem verwendeten Antikörper kreuzreagiert. Aber erst nach Infektion mit den entsprechenden Viren, die für $G\beta$ -Untereinheiten kodieren, können stärkere Banden bei 36 kDa im Westenblot nachgewiesen werden.

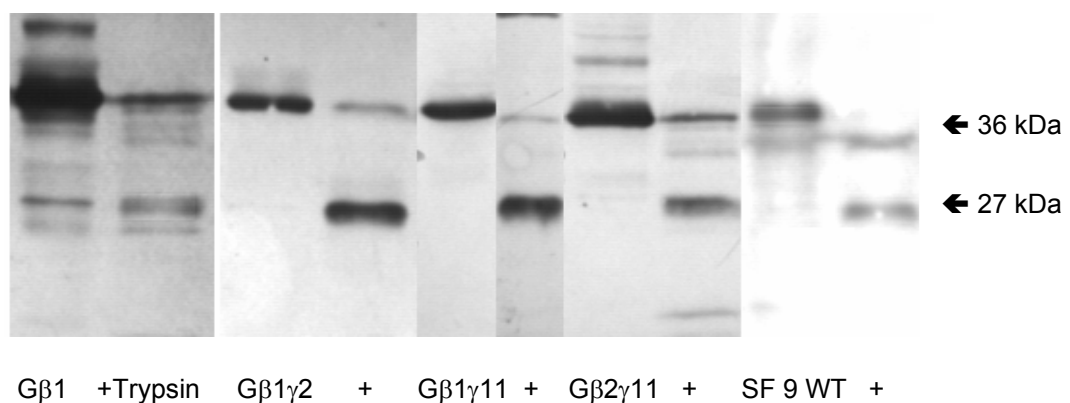


Abb. 4.6: An der abnehmenden Intensität der 36kDa Bande nach Behandlung mit Trypsin (als „+“ dargestellt) kann man erkennen, dass ein Grossteil der $G\beta$ -Proteine vom Trypsin gespalten wurde. Die Intensität der Bande in Höhe von 27kDa, die ein geschütztes Fragment anzeigt, ist bei $G\beta 1\gamma 2$ und $G\beta 1\gamma 11$ am größten. $G\beta 1$ allein

wird fast vollständig gespalten. Bei der schwachen 27kDa Bande auf der Spur der Sf9-WT Membranen handelt es sich möglicherweise um endogene G-Proteine der Insektenzellen, deren Sequenz allerdings nicht bekannt ist. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Diese Ergebnisse belegen, dass es möglich ist, die Methodik der Protektion vor tryptischem Verdau zur Analyse der G $\beta\gamma$ -Dimerisierung auch an Membranen von Sf9-Insektenzellen durchzuführen.

4.3.2. Analyse von G $\beta\gamma$ - Dimeren

Unter denselben Bedingungen wie in den obigen Versuchen wurden eine Reihe von Membranen mit G $\beta\gamma$ -Kombinationen durch Trypsin gespalten und im Western- Blot visualisiert. Im einzelnen waren dies G β 3 mit G γ 2, G γ 3, G γ 4, G γ 5, G γ 7, G γ 8, G γ 10, G γ 12. In allen Fällen konnten keine Banden bei 27kDa sichtbar gemacht werden. Auch eine Änderung der Trypsinmenge und Inkubationszeit veränderte das Ergebnis nicht (Abb.4.7, nur G β 3 γ 2 bis γ 5).

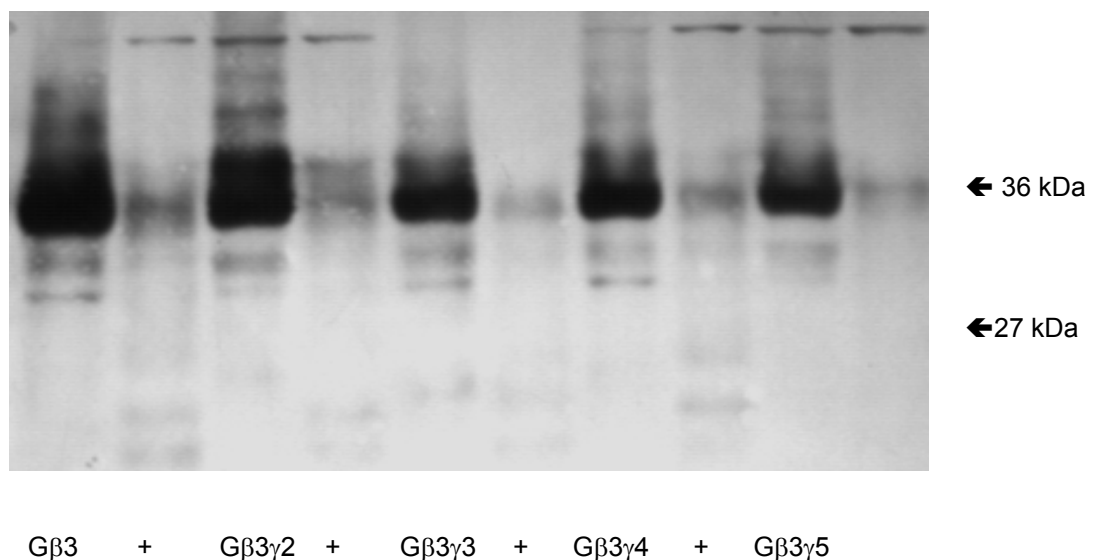


Abb. 4.7: Die G-Protein Dimere wurden vollständig gespalten, es lässt sich keine erwartete Bande bei 27 kDa nachweisen (nach Verdau mit Trypsin als „+“ gekennzeichnet). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

4.3.3. Analyse von $G\beta 3s\gamma$ - Dimeren

Wie für $G\beta 3$ beschrieben wurden folgende Membranen mit $G\beta 3s\gamma$ -Kombinationen gespalten: $G\beta 3s$ mit $G\gamma 2$, $G\gamma 3$, $G\gamma 4$, $G\gamma 5$, $G\gamma 7$, $G\gamma 8$, $G\gamma 12$.

Wie bereits bei den vorher beschriebenen Experimenten ließ sich $G\beta 3s$ auch in dieser Versuchsreihe mit dem Antikörper $G\beta_{\text{common}}$ anhand seines kleinen Molekulargewichtes eindeutig identifizieren (Abb.4.8).

Bei keiner der Kombinationen ließ sich eine Protektion vor tryptischem Verdau nachweisen, obwohl der Grossteil des eingesetzten Materials gespalten wurde, welches an einer Verringerung der Intensität der entsprechenden Bande nach Trypsinbehandlung sichtbar ist.

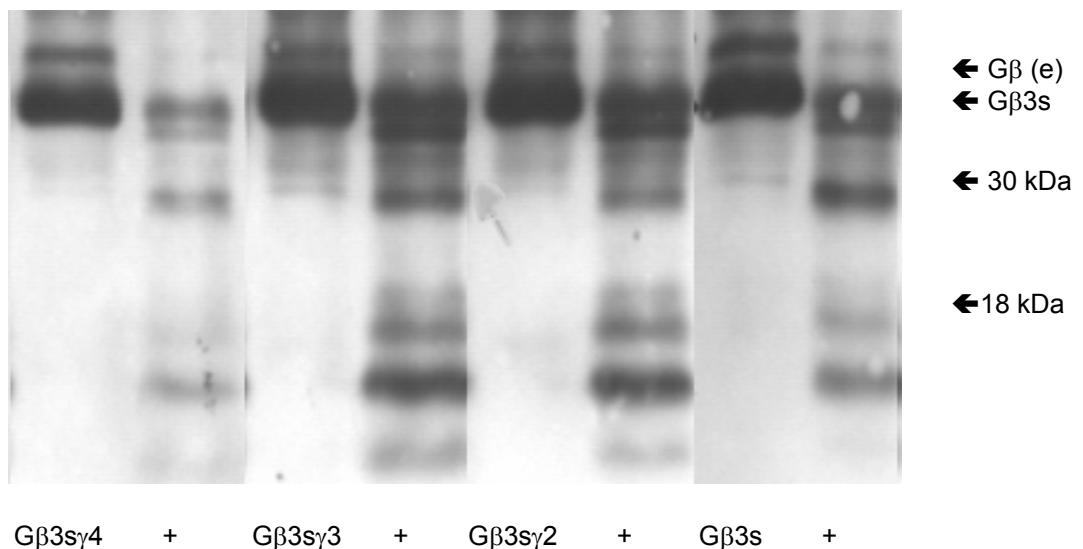


Abb. 4.8: Die Abbildung zeigt die Spaltung von $G\beta 3s\gamma$ -Dimeren. Es stellt sich kurz oberhalb von $G\beta 3s$ vermutlich endogenes $G\beta$ aus den Sf9 -Zellen dar ($G\beta(e)$). Im Gegensatz zu den Experimenten mit $G\beta 1$, $G\beta 2$ oder $G\beta 3$ fällt hier im Fall von $G\beta 3s$ auf, dass nach Spaltung mit Trypsin eine Restbande in Höhe von $G\beta 3s$ verbleibt. Möglicherweise deutet dies auf einen unvollständigen Verdau. Außerdem findet sich kurz darunter und in Höhe von 27 kDa ebenfalls eine neue Bande, die von dem Antikörper erkannt wird. Dieses Muster findet sich auch bei $G\beta 3s$ -

Membranpräparationen ohne koinfizierte G γ -Untereinheit. Repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Bei genauerer Betrachtung des Bandenmusters in Abb. 4.8. fällt auf, dass im Gegensatz zu den entsprechenden Experimenten mit G β 1, G β 2 und G β 3 ein komplexes Restbandenmuster entsteht, das sich nicht einfach interpretieren lässt. Bei dem klassischen Schutz vor tryptischer Spaltung z.B. von G β 1 entsteht ein tryptisches Fragment, das in seiner molaren Menge der Ausgangsmenge entspricht, mithin vom Antikörper in gleicher Intensität wie in den nicht mit Trypsin verdauten Spuren erkannt werden sollte. Dies ist hier nicht der Fall. Ausserdem tritt dieses Bandenmuster auch bereits für G β 3s auf, das ohne G γ -Untereinheit exprimiert wurde. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich hier um Fragmente eines möglicherweise endogen vorkommenden G β -Proteins der Insektenzellen handelt, da dies mit den Betrachtungen zur Intensität der Ursprungsbande nicht in Einklang zu bringen ist.

4.3.4. Analyse von G β 3 γ - Dimeren mit der Proteinase Arg-C

Bei genauer Sequenzanalyse von G β 3 fällt auf, dass G β 3 im Vergleich zu G β 1 eine mögliche Trypsinierungsstelle (Lysin 177) mehr besitzt (Ray et al., 1995). Das Lysin 177 würde sich theoretisch in dem gesuchten 27 kDa Fragment wieder finden und dann einer möglichen vollständigen Spaltung den Weg öffnen.

Daher verwendeten wir in folgenden Versuchen mit G β 3s die Proteinase Arg-C. Dieses Enzym spaltet selektiv an Argininen, während Trypsin an Lysin- und Argininresten spaltet. Folgende G β 3 γ -Kombinationen wurden in Sf9-Zellen exprimiert und als Membranen gespalten: G β 3s mit G γ 2, G γ 3, G γ 4, G γ 5, G γ 7, G γ 8, G γ 12. Die Spaltung der Membranen war inkomplett und deutlich geringer als beim Trypsin, was an der geringeren Abnahme der Signalintensität der 36kDa Bande zu sehen ist (Abb. 4.9, nur G β 3 γ 7 und G β 3 γ 8). Hier veränderte auch eine Verringerung der eingesetzten Membranmenge sowie eine Verlängerung der Inkubationszeit mit der Proteinase das Ergebnis nicht. Auch bei dem Teil, der

gespalten wurde, lässt sich keine 27 kDa Bande erkennen, so dass man von keinen geschützten Fragmenten ausgehen kann. Weiterführende Erkenntnisse brachte diese Methode somit ebenfalls nicht.

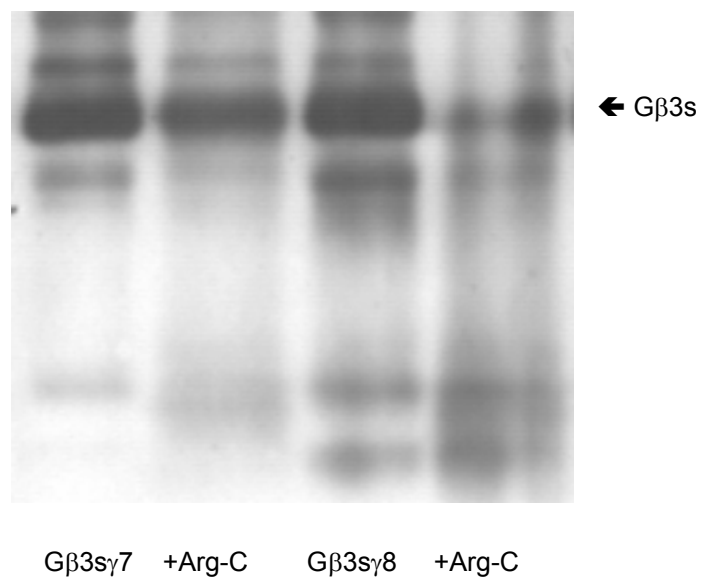


Abb. 4.9: Die Abbildung zeigt am Beispiel von $G\beta 3s\gamma 7$ und $G\beta 3s\gamma 8$ den inkompletten Vedau durch die Proteinase Arg-C. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die G-Protein Untereinheit $G\beta_3s$, die mit dem Auftreten der Hypertonie assoziiert ist, im Hinblick auf die Dimerbildung mit der $G\gamma$ -Untereinheit näher zu charakterisieren.

Zuerst wurde im Westernblot gezeigt, dass Sf9-Zellen nach Transfektion durch Baculoviren, die für G-Proteinuntereinheiten kodieren, in der Lage sind G-Proteinuntereinheiten zu exprimieren.

Funktionell konnte mittels radioaktiv markiertem $GTP\gamma S$ eine Aktivität von $G\beta_3s\gamma$ - Dimeren in Sf9-Zellen nachgewiesen werden, wie es auch für $G\beta_3$ der Fall war.

Der biochemische Nachweis der Dimerbildung, der mittels Trypsinierung geführt werden sollten, gelang jedoch weder für $G\beta_3s$ noch für $G\beta_3$.

Wahrscheinlich ist die Trypsinierungsmethode für den Nachweis von Dimeren, welche $G\beta_3$ Untereinheiten enthalten, nicht geeignet.

5.1. Existenz von $G\beta_3s\gamma$ - Dimeren

Die Existenz von $G\beta_3s\gamma$ - Dimeren wurde durch die Aktivität von radioaktiv markiertem $GTP\gamma S$ nachgewiesen. Es hat sich gezeigt, dass $G\beta_3s$ zusammen mit $G\alpha_2$ und $G\gamma_5$ in Sf9-Zellen exprimiert und anschließend mit MAS-7 stimuliert, bei bestimmten MAS-7 Konzentrationen eine höhere Stimulation im Sinne einer $GTP\gamma S$ Bindung aufweist als Trimere mit $G\beta_3$. Dies lies sich aber nur für bestimmte $G\beta\gamma$ Dimere nachweisen, denn ebenso wie $G\beta_3$ bildet auch $G\beta_3s$ nicht mit jedem $G\gamma$ ein Dimer. Die Spezifität der beiden in Bezug auf $G\gamma$ scheint jedoch unterschiedlich zu sein. Diese Versuche zeigten, dass prinzipiell $G\beta_3s\gamma$ -Dimere gebildet werden können und dass Sf9-Zellen in der Lage sind, funktionsfähige Dimere zu translatieren.

5.2. „Schutz vor tryptischem Verdau“ – Grenzen der Methodik

Warum konnten diese Dimere aber nicht durch Trypsinierung nachgewiesen werden, wie es für Dimere der Fall ist, welche $G\beta_1$ enthalten ?

Dazu sollte man sich die Struktur eines $G\beta\gamma$ -Dimers in Erinnerung rufen.

Das G $\beta\gamma$ -Dimer ist ein sehr dicht gepacktes Protein, welches nur *in vitro* getrennt werden kann, während es *in vivo* immer als Dimer vorliegt. Durch die Dimerbildung werden die für Trypsin zugänglichen Sequenzmotive der G β -Untereinheit so überlagert, dass die einem Verdau zugänglichen Motive geschützt werden. Ein Grund dafür, dass G $\beta_3\gamma$ -Dimere durch Trypsin vollständig verdaut werden, wäre, dass diese Dimere weniger dicht gepackt sind. Trypsin hätte hier Zugang zu mindestens einer weiteren potentiellen Trypsinierungsstelle, so dass die Bildung eines 27kDa Fragments ausbleibt.

Auch die zusätzliche Trypsinierungsstelle bei der Aminosäure 177 (Lysin), die nur in G β_3 -Untereinheiten vorkommt, wurde als Grund für das Ausbleiben des 27kDa Fragments ausgeschlossen. Es wurden G $\beta_3\gamma$ -Dimere mit einer Proteinase gespalten, welche nur am Arginin ansetzt. Aber auch hier ließ sich kein 27kDa Fragment nachweisen.

Bislang von anderen Arbeitsgruppen untersuchte G $\beta\gamma$ -Dimere:

E. Neer et al. kamen mittels Trypsinierung zu folgenden Ergebnissen:

G $\beta_1\gamma_1$	27kDa Fragment nachgewiesen
G $\beta_1\gamma_2$	27kDa
G $\beta_2\gamma_1$	negativ
G $\beta_2\gamma_2$	27kDa
G $\beta_3\gamma_1$	negativ
G $\beta_3\gamma_2$	negativ

Ergebnisse von J. Robishaw et al:

G $\beta_1\gamma_2$	27kDa
G $\beta_1\gamma_4$	27kDa
G $\beta_1\gamma_{10}$	27kDa
G $\beta_1\gamma_{11}$	27kDa
G $\beta_2\gamma_2$	27kDa
G $\beta_2\gamma_4$	27kDa
G $\beta_2\gamma_{10}$	27kDa

G β 2 γ 11	negativ
G β 3 γ 2	negativ
G β 3 γ 4	negativ
G β 3 γ 10	negativ
G β 3 γ 11	negativ

Die Ergebnisse der Trypsinierung von G β γ -Dimeren der Arbeitsgruppe um E. Neer, welche aus Kaninchenretikulozytenlysat gewonnen wurden, sind durch zwei weitere Methoden bestätigt (Schmidt et al., 1992).

Zum ersten wurden translatierte G β - und G γ -Untereinheiten inkubiert und anschließend der Stoke – Radius über eine Gelfiltration mittels Ultrogel bestimmt. Dazu wurden Marker mit bekanntem Stoke-Radius benutzt und die Fraktionen aus der Gel-Chromatografie in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass der Stoke-Radius bei den G β -Untereinheiten, welche vermutlich ein Dimer mit G γ -Untereinheiten bilden, von ca. 49 auf 30 abnahm. Die Dimerbildung mit der G γ -Untereinheit löst wahrscheinlich eine Konformationsänderung in der G β -Untereinheit aus, so dass das Molekül eine kompaktere Struktur bekommt. Wie oben erwähnt, könnte genau dies bei G β 3 γ -Dimeren anders aussehen, so dass es hier durch eine andere Konformation des Dimers nicht zu einem Schutz der potentiellen Trypsinierungsstellen kommt.

Bei der zweiten Methode wurde BMH benutzt, ein sogenannter „Crosslinker“, welcher in der Lage ist, ein G β γ -Dimer über die Cystinreste in der G β -Untereinheit so zu verknüpfen, dass ein stabiles, 45kDa großes Fragment entsteht, welches in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese sichtbar gemacht wird. Auch hier stimmten die Ergebnisse mit der Trypsinierung überein, d.h. es zeigte sich nur ein 45kDa Fragment bei G β 1 γ 1, G β 1 γ 2 und bei G β 2 γ 2. Für ein G β 3 γ -Dimer ließ sich bei keiner dieser Methoden ein Hinweis für eine Dimerbildung finden. Die Ergebnisse lassen sich also gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren, da auch hier nur für G β 1 γ -Dimere positive Nachweise gelangen.

5.3. Wichtige Regionen im G β - und G γ - Molekül für die Dimerbildung

D.Spring und E.Neer beschäftigten sich mit der Frage, warum G γ 2 mit G β 1 und G β 2 Dimere bildet, während G γ 1 nur mit G β 1 und nicht mit G β 2 Dimere bildet, obwohl G β 1 und G β 2 zu 90% in ihrer Aminosäuresequenz gleich sind. Das veranlasste sie dazu, Proteinkonstrukte ähnlicher Struktur wie G γ 1 und G γ 2 herzustellen, um herauszufinden, welche Stellen in G γ für die Selektivität gegenüber G β verantwortlich sind. Ein Ersetzen von 14 Aminosäuren in G γ 2 (AS 36-49) durch die Aminosäuren 33-46 aus G γ 1 führte dazu, dass sich dieses Konstrukt wie G γ 1 verhält. Umgekehrt verhielt sich das Konstrukt wie G γ 2, wenn in G γ 1 die Aminosäuren aus G γ 2 eingefügt wurden. Daraus folgt, dass diese 14 AS Region in G γ 1 dafür verantwortlich ist, zwischen G β 1 und G β 2 zu unterscheiden (Spring, Neer, 1994). Diese Region ist in den beiden G γ -Untereinheiten insofern verschieden, dass sie in G γ 1 relativ geladen ist, während sie in G γ 2 ungeladen und Alanin-reich ist. Diese Region enthält auch Cystin, welches bei der Behandlung mit BMH eine Bindung mit G β eingeht.

Auch die Arbeitsgruppe um J.D. Robishaw untersuchte eine Reihe von G γ -Monomeren im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Dimerbildung mit G β 1, G β 2 und G β 3 (Ray et al., 1995). Auch hier wurden die G-Proteinuntereinheiten in einem Retikulozytenlysat translatiert, anschließend mit Trypsin inkubiert und auf das 27kDa Fragment hin mittels Gelelektrophorese untersucht. Ebenfalls kein Dimernachweis gelang für alle untersuchten G β 3 γ Kombinationen. G β 1 bildete mit G γ 1 und G γ 11 ein Dimer. Ebenso wie G γ 1 bildet auch G γ 11 kein Dimer mit G β 2. Dies überrascht nicht, wenn man bedenkt, dass G γ 1 und G γ 11 mit 76% eine große Übereinstimmung bezüglich ihrer Aminosäuresequenz zeigen. Auch die oben erwähnte 14 AS Region, welche verantwortlich für die Unterscheidung zwischen G β 1 und G β 2 sein soll, ist in G γ 11 gut konserviert. Ein Unterschied besteht darin, dass G γ 1 nur in der Retina vorkommt, während G γ 11 in verschiedenen Geweben exprimiert wird (Cali et al., 1992).

Diese Erkenntnisse zu G γ schließen aber nicht aus, dass auch in der G β -Untereinheit Domänen existieren, welche für die Selektivität der Dimerbildung eine

Rolle spielen. Einen großen Teil der Interaktionsfläche des G β -Moleküls mit dem G γ -Molekül macht die α -Helix am N-terminalen Ende der G β -Untereinheit aus (Lupas et al., 1992), welche wichtig für die Dimerbildung ist. Sie spielt jedoch für die Spezifität in Bezug auf G γ -Monomere keine Rolle. Diese N-terminale Region von G β muss nahe an der G γ -Untereinheit liegen, da sie Cystin enthält, welches durch BMH mit dem Cystin im G γ -Molekül gecrosslinkt werden kann (Bubis & Khorona, 1990). Auch die Arbeitsgruppe um Gautam beobachtete nach einer Veränderung der α -Helix von G β 1 eine verminderte Dimerbildung mit G γ *in vitro* (Yan & Gautam, 1997). Die Bindung mit Effektoren wie AC2 und PLC- β 2 wurde dagegen nicht beeinflusst. Hinweise dafür, dass die G γ -Untereinheit eher mit den Effektoren interagiert, während die G β -Untereinheit für die Interaktion mit dem Rezeptor bestimmend ist, liefert Lohse mit seiner Arbeitsgruppe. (Müller et al., 1993). In dieser Arbeit wurden fünf G $\beta\gamma$ -Kombinationen untersucht, welche zuvor in Sf9-Zellen exprimiert wurden: Jeweils G β 1 und G β 2 mit G γ 2 und G γ 3, außerdem noch Transduzin (G β 1 γ 1). Es zeigte sich, dass die β -Adrenorezeptorkinase (β -ARK) vermittelte Phosphorylierung von Rhodopsin bei den Dimerkombinationen mit G γ 2 sehr viel höher war, als bei den Kombinationen, welche G γ 3 enthielten. G β 1 γ 2 und G β 2 γ 2 hatten also ähnliche maximale Effekte auf die Phosphorylierung von Rhodopsin, andererseits zeigt aber G β 2 γ 2 eine viel höhere Affinität zu Rhodopsin als G β 1 γ 2, obwohl G β 1 der physiologische Partner von Rhodopsin ist. Im Falle der Phosphorylierung des β 2-adrenergen Rezeptors, zeigte sich nur G β 1 γ 2 als eine sehr effektive Kombination. Da aber G β 2 γ 2 effektiver in der β -ARK vermittelten Phosphorylierung von Rhodopsin als G β 1 γ 2 war, liegt die Vermutung nahe, dass G β die Rezeptorselektivität in diesem System bestimmt. In dieser Arbeit von Lohse bindet also G β 1 effektiver als G β 2 an den β 2-adrenergen Rezeptor. Die Fähigkeit von G β 1 mit G γ 1 aber nicht mit G γ 2 zu dimerisieren ist in einer Region des WD Repeat 5 begründet (Pronin & Gautam, 1992).

5.4. Funktionelle Ergebnisse von G β 3 γ - Dimeren

Die Arbeitsgruppe von N. Gautam untersuchte verschiedene G $\beta\gamma$ -Dimere mittels eines Two-Hybrid-Systems (Yan et al., 1996). Hierbei werden die beiden Untereinheiten als Hybride in Hefezellen exprimiert, d.h. jedes Plasmid enthält

zusätzlich zur Information für die G-Protein-Untereinheit einen DNA-Abschnitt, welcher für den Teil eines Transkriptionsfaktors kodiert. Kommt es nun zur Interaktion der beiden Untereinheiten, d.h. zur Dimerbildung, nähern sich auch die beiden Domänen für den Transkriptionsfaktor, welcher dann einen Promotor aktiviert, der wiederum zur Bildung von β -Galaktosidase führt. So lässt sich anhand des β -Galaktosidasenachweises die Dimerbildung ablesen. Diese Methode gilt als sehr sensitiv, da durch sie schon Nachweise von Proteininteraktionen gelangen, bei denen die Immunopräzipitation versagte (Li & Fields, 1993). Außerdem wurde für diese Methode in derselben Arbeit gezeigt, dass die Menge der gebildeten Proteinkomplexe proportional zur Aktivität des Reportergens (β -Galaktosidase) ist. Die Ergebnisse von Gautam und seinen Kollegen bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeit, mit dem Unterschied, dass mit dem Two-Hybrid-System ein positiver funktioneller Nachweis für alle untersuchten $G\beta\gamma$ -Kombinationen im Vergleich zur Negativkontrolle gelang. Im Einzelnen waren dies folgende Kombinationen:

$G\gamma 1$, $G\gamma 2$, $G\gamma 3$, $G\gamma 4$, $G\gamma 5$, $G\gamma 7$ jeweils mit $G\beta 1-5$.

Dies würde den Schluss erlauben, dass prinzipiell jede dieser Kombinationen zur Assoziation fähig ist, wenn auch in sehr unterschiedlichem Umfang. Allerdings darf man Assoziation weder mit Dimerbildung noch mit funktioneller Rezeptoraktivität und Effektorinteraktion gleichsetzen.

Für $G\beta 1\gamma 1$ zeigte sich auch hier im Vergleich zu $G\beta 2\gamma 1$ und $G\beta 3\gamma 1$ eine höhere Reporter-Gen Aktivität (β -Galaktosidasemenge). Diese Ergebnisse bestätigen außerdem die Tatsache, dass $G\beta 1$ genau wie $G\gamma 1$ im Gegensatz zu $G\beta 2$ und $G\beta 3$ in den Stäbchen der Retina zu finden ist (Lee et al., 1992). Im Vergleich zu allen anderen $G\beta$ -Untereinheiten zeigten sich für die $G\beta 3\gamma$ -Kombinationen immer die geringsten Aktivitäten des Reporter-Gens β -Galaktosidase.

Dies unterstreicht die Ergebnisse dieser Arbeit und könnte bedeuten, dass die verwendete Methode der Trypsinierung für den $G\beta 3\gamma$ Nachweis nicht sensitiv genug ist. Es werden wahrscheinlich sehr hohe Expressionsraten von $G\beta 3$ benötigt, um mit $G\gamma$ zu interagieren. Die $G\beta$ -Untereinheiten, welche in den verschiedensten Geweben zu finden sind und sich am häufigsten nachweisen lassen, stellen $G\beta 1$ und $G\beta 2$ dar. Entsprechend dieser Tatsache ist ihre Präferenz mit allen $G\gamma$'s Dimere zu bilden, auch am größten.

Somit könnten die $G\beta 3$ -Untereinheiten eine Sonderstellung unter den $G\beta$ -Untereinheiten einnehmen. Die Dimerbildung mit $G\gamma$ -Untereinheiten ist prinzipiell

möglich, wie aus den funktionellen Untersuchungen im GTP γ S Versuch und im Two-Hybrid-System ersichtlich wird. Jedoch scheint das G β 3 γ -Molekül anders gepackt zu sein, als übrige G β γ -Moleküle. Dies lässt auch eine fehlende Abnahme des Stoke-Radius vermuten. So ist wahrscheinlich die Trypsinierungsmethode für G β 3 γ -Dimere nicht geeignet, andererseits ist sie aber auch nicht sensitiv genug, da man davon ausgehen muss, dass G β 3 γ -Dimere in geringerem Umfang gebildet werden als andere G β γ -Dimere.

5.5. Bedeutung der G β γ - Heterogenität und der gesteigerten Signaltransduktion im Falle von G β 3s in Bezug auf das kardiovaskuläre System

Die vielfältigen Möglichkeiten einer Zelle verschiedene G β - und G γ -Untereinheiten, aber auch G α -Untereinheiten zu kombinieren, erlaubt eine hohe Flexibilität der Steuerung von Signaltransduktionsvorgängen. Durch die unterschiedliche Aktivität der verschiedenen G β γ -Dimere in Bezug auf die Aktivierung von Effektoren ist eine quantitative Abstufung des Signals möglich. Andererseits haben G β γ -Dimere die Möglichkeit, die Qualität des Signals zu beeinflussen. Bei den verschiedenen Adenylatzyklaseformen zum Beispiel wird die Isoform 1 gehemmt, während AC2 und AC4 stimuliert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit durch Phosphorylierung die Sensibilität des Rezeptors durch G β γ -Dimere zu beeinflussen. Denkbar sind diese Variationen durch eine unterschiedliche Affinität der G-Proteinuntereinheiten untereinander, aber auch in Bezug auf die Effektoren. Berücksichtigt man zusätzlich, dass ein Rezeptor mehrere G-Proteine gleichzeitig aktivieren kann, wird deutlich, wie komplex aber auch vielfältig die Signaltransduktion in Zellen ist.

Was kann nun aber eine gesteigerte Aktivität von G β γ -Dimeren *in vivo* bewirken, wie es bei der Splice-Variante G β 3s der Fall ist? Dazu muss man die Effektoren und die weiteren Signaltransduktionwege genauer betrachten:

Der Na⁺/H⁺ Austauscher, ein Ionen-Transport System, wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert. Auch er untersteht der Regulation durch G-Proteine, wird beeinflusst durch Phosphorylierung über Kinasen und durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Durch dieses System wird z.B. der intrazelluläre

pH-Wert reguliert. Bei immortalisierten Lymphozyten von Hypertonikern konnte gezeigt werden, dass diese eine erhöhte Aktivität des Na^+/H^+ Austauschers besitzen und außerdem eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen, wobei sie schneller den Zellzyklus als die Lymphozyten von Normotonikern durchlaufen (Rosskopf et al., 1992), (Rosskopf et al., 1995). Die Mutation in einem Gen für den Na^+/H^+ Austauscher oder dessen Überexprimierung konnte ausgeschlossen werden. Da die Ergebnisse *in vitro* gewonnen wurden, kommen daher Einflüsse welche *in vivo* die Aktivität des Na^+/H^+ Austauscher beeinflussen, nicht in Betracht. Ebenfalls assoziiert mit der gesteigerten Aktivität des Austauschers bei Hypertonikern ist der Polymorphismus 825T, welcher zur Bildung der Splicevariante $\text{G}\beta 3\text{s}$ führt. Die gesteigerte Aktivität von $\text{G}\beta 3\text{s}\gamma$ -Dimeren, welche im $\text{GTP}\gamma\text{S}$ Versuch gezeigt wurde, könnte verantwortlich sein für den gesteigerten Na^+/H^+ Austausch. Weiterhin erhöht in diesen Zellen von Hypertonikern war die Ca^{2+} Konzentration nach Stimulation mit Agonisten, wie plättchenaktivierender Faktor oder Somatostatin. Interessanterweise waren diese Signaltransduktionsvorgänge nur bei Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen von Hypertonikerzelllinien verändert.

5.5.1. Hypertonie

Die pathophysiologischen Vorgänge, welche zur Hypertonie führen, bzw. deren Manifestation begünstigen, lassen sich anhand des G-Protein Modelles gut darstellen:

Bei der Pathologie der Hypertonie spielt der erhöhte Widerstand in den Gefäßen eine Rolle, bedingt durch einen erhöhten Kontraktilitätszustand der Zellen, andererseits wird eine abnormale Proliferation dieser Zellen beobachtet, bekannt als Mediahypertrophie. Beide Tatsachen sind mit einer gesteigerten Signaltransduktion über PTX-sensitive G-Proteine vereinbar. Es ist denkbar, dass vasokonstriktive Agonisten, wie z.B. Noradrenalin G_i -Proteine über den $\alpha 2$ -Adrenorezeptor stimulieren, und bestimmte $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere, wie z.B. $\text{G}\beta 3\text{s}\gamma 5$ über die PhospholipaseC zu einer erhöhten Kalziumkonzentration im Zytosol führen. Dieser Mechanismus führt dann zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen der Gefäße. Da $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere ebenso Effektoren kontrollieren, welche zu einer Zellproliferation führen, wäre auch die o.g. Mediahypertrophie mit einer gesteigerten Signaltransduktion vereinbar. Dies

könnte über eine Aktivierung der MAP-Kinase geschehen, welche die Expression von Wachstumsfaktoren nach sich zieht.

Aber nicht nur glatte Muskelzellen von Hypertoniepatienten, sondern auch Thrombozyten exprimieren PTX-sensitive Gi-Proteine, welche z.B. durch Thrombin und Noradrenalin über α_2 -Rezeptoren aktiviert werden. Auch bei diesen Zellen kann eine erhöhte Aktivität von G $\beta\gamma$ -Dimeren die erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentrationen erklären, welche zu gesteigerter Aggregation und reduzierten cAMP-Konzentrationen führen (Touyz & Schiffrin, 1993), (Hoffmann et al., 1992), (Frey et al., 2003).

5.5.2. Linksventrikuläre Hypertrophie

Auch die mit bis zu 50% bei Hypertoniepatienten vorkommende linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) könnte durch das G-Protein Modell erklärt werden. Meistens interpretiert als ein Anpassungsvorgang des Herzens an die erhöhten systolischen Blutdruckwerte, ist die Ausprägung der LVH nicht bei allen Patienten gleich. Diese Tatsache lässt eine erbliche Komponente vermuten, d.h. eine unterschiedliche Bereitschaft der Zellen auf Stimulation mit einer Hypertrophie zu antworten. Diese erhöhte Neigung zur LVH konnte in einer Studie an Kindern von Hypertonikern nachgewiesen werden. Noch bevor bei ihnen erhöhte Blutdruckwerte manifest waren, konnten Zeichen einer LVH nachgewiesen werden (Hansen et al., 1992). Weiterhin gestützt wird die Annahme, dass veränderte G-Proteine bei der Entwicklung der LVH eine Rolle spielen, durch die Tatsache, dass die Aktivierung der MAP-Kinase in Kardiomyozyten über PTX-sensitive G-Proteine erfolgt (Bogoyevitch et al., 1995). Außerdem wurde eine Assoziation von vermehrter linksventrikulärer Muskelmasse mit der G-Protein-Untereinheit G β_3 s gezeigt (Semplicini et al., 2001).

5.5.3. Koronare Herzkrankheit

Erhöhte Blutdruckwerte sind ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung einer Arteriosklerose, besonders der koronaren Herzkrankheit. Die konsequente Senkung von erhöhten Blutdruckwerten führt zu einer signifikanten Minderung des Risikos für einen apoplektischen Insult, während das Risiko der KHK nur um 20%

gesenkt wird (Swales & de Bono, 1993). Dies kann bedeuten, dass ebenso wie bei der LVH nicht allein der erhöhte Blutdruck für die Arteriosklerose verantwortlich ist, sondern auch hier die erhöhte Aktivität von PTX-sensitiven G-Proteinen bei Hypertonikern eine Rolle spielt. Die erhöhte Stimulierbarkeit von Thrombozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen kann zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen und eine Intimahypertrophie bzw. eine vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix nach sich ziehen, was letztendlich die Entstehung einer Arteriosklerose begünstigt.

Weiterhin wurde eine Assoziation zwischen 825T-Allel Trägern und der koronaren Vasokonstriktion beschrieben (Meirhaeghe et al., 2001)

5.5.4. Umweltfaktoren und andere Einflüsse

Wie bei vielen anderen multifaktoriellen Krankheitsbildern führt nicht allein die genetisch determinierte Expression von veränderten G-Protein Untereinheiten zu einer Manifestation von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Berücksichtigt werden müssen auch andere Faktoren wie Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüsse, welche in Kombination mit der genetischen Disposition zur klinischen Manifestation der Erkrankung führen. Zum Beispiel spielt für die Intensität der Zellantwort auch die Menge und die Frequenz der Agonistenstimulation eine Rolle. Gerade diese Frequenz und Intensität der Agonistenstimulation kann durch äußere Faktoren enorm beeinflusst werden. Nikotin oder Stress z.B. führen zu einer Freisetzung von Noradrenalin, welches α_2 -Rezeptoren stimuliert und dadurch zu einer Erhöhung der RR-Werte führt. Eine genetisch determinierte überschießende G-Proteinaktivierung, wie im Falle von G $\beta_3\gamma$ -Dimeren, kann daher die Effekte dieser Agonisten um ein Vielfaches potenzieren.

6. Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen eine herausragende Rolle bei der Vermittlung von Signaltransduktionsvorgängen. Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren aktivieren G-Proteine, welche aus drei Untereinheiten zusammengesetzt sind.

In Zelllinien von Hypertonikern wurde ein Polymorphismus (C825T) im Gen GNB3 gefunden, welches für die G β 3-Untereinheit kodiert. Es zeigte sich, dass dieser Polymorphismus mit der Expression einer mRNA-Spleissvariante von G β 3 vorkommt, die als G β 3s bezeichnet wird und bei der 41 Aminosäuren deletiert sind. Gegenstand dieser Arbeit war die eingehende biochemische Charakterisierung von G β 3s im Hinblick auf die mögliche Dimerbildung mit G γ -Untereinheiten.

Es wurde zunächst gezeigt, dass die Expression von G-Protein β - und γ -Untereinheiten mit Hilfe von rekombinanten Baculoviren in Sf9-Zellen möglich ist. Versuche zur stimulierten [35 S]GTP γ S Bindung belegten, dass diese in Sf9-Zellen transfizierten G-Proteinuntereinheiten funktionell aktiv sind.

Für G β 1 γ - Dimere konnte ein eindeutiger biochemischer Nachweis der Dimerbildung durch die Methode der Trypsinspaltung geführt werden. Bei dieser Methode wird die G β -Untereinheit nach erfolgter Dimerisierung mit einer G γ -Untereinheit vor Trypsinspaltung geschützt, nicht jedoch die nicht dimerisierten G β -Untereinheiten. Dieser biochemische Nachweis gelang jedoch nicht für G β 3 γ Dimere, obwohl funktionelle Untersuchungen die Bildung stimulierbarer G β 3 γ - und G β 3s γ -Dimere nahe legen. Auch der Einsatz einer anderen Proteinase resultierte nicht in einem Schutz vor Spaltung. Es muss angenommen werden, dass diese biochemische Methode für den Nachweis von G β 3 γ -Dimeren nicht geeignet ist.

Es ist denkbar, dass G β 3 γ -Dimere eine andere dreidimensionale Struktur aufweisen als die übrigen G β γ -Dimere. Möglicherweise ist die verwendete Methode auch nicht sensitiv genug für den Nachweis von G β 3 γ -Dimeren.

Die G β 3 - Untereinheiten könnten somit eine biochemische Sonderstellung unter den G β -Untereinheiten einnehmen.

7.Literaturverzeichnis

1. Benjafeld, A.V., Jeyasingam, C.L., Nyholt, D.R., Griffith, L.R., Morris, B.J. (1998): G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 32, 1094-1097.
2. Bogoyevitch, M.A., Clerk, A., Sugden, P.H. (1995): Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathways in cultured ventricular myocytes. *Biochem. J.* 309, 437-443.
3. Boyer, J.L., Waldo, G.L., Harden, T.K. (1992): $\beta\gamma$ -Subunit activation of G protein regulated phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 267, 25451-25456.
4. Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran N., Johnson, G.L. (1995): G α 12 and G α 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 24631-24634.
5. Bubis, J., Khorona, H.C., (1990): Sites of interaction in the complex between β - and γ - subunits of transducin. *J. Biol. Chem.* 265, 12995-12999.
6. Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., Hamm, H.E. (2003): Insights into G protein structure, function and regulation. *Endocr. Rev.* 24, 765-781.
7. Cali, J.J., Balcueva, E.A., Rybalkin, I., Robishaw, J.D. (1992): Selective tissue distribution of G protein gamma subunits, including a new form of the gamma subunits identified by cDNA cloning. *J.Biol.Chem.* 267, 24023-24027.
8. Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., Gierschik, P. (1992): Isozyme-selective stimulation of phospholipase c- β 2 by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 360, 684-686.
9. Carty, D.J., Padrell, E., Codina, J., Birnbaumer, L., Hildebrandt, J.D., Iyengar, R.J. (1990): Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three Gi Proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 6268-6273.
10. Clapham, D.E., Neer, E.J. (1993): New roles for G-protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403-406.
11. Clapham, D.E. (1995): Calcium signalling. *Cell.* 80, 259-269.
12. Clapham, D.E., Neer, E.J. (1997): G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol.* 37, 167-203.
13. Conklin, B.R., Bourne, H.R. (1993): Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$, receptors and effectors. *Cell* 73, 631-641.

14. Crespo, P., Xu, N.Z., Simonds, W.F., Gutkind, J.S. (1994): Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 369, 418-420.
15. Dietrich, A., Brazil, D., Meister, M., Schrader, M., Moomaw, J.F. (1996): Isoprenylation of the G-protein γ subunit is both necessary and sufficient for $\beta\gamma$ dimer-mediated stimulation of phospholipase C. *Biochemistry* 35, 15174-15182.
16. Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.C., Lefkowitz, R.J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment-receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 653-688.
17. Dong, Y., Zhu, H., Sagnella, G.A., Carter, N.D., Cook, D.G., Cappuccio, F.P. (1999): Association between the C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 34, 1193-1196.
18. Dong, Y., Zhu, H., Wang, X., Dalageorgou, C., Carter, N., Spector, T.D., Snieder, H. (2004): Obesity reveals an association between blood pressure and the G-protein beta3-subunit gene: a study of female dizygotic twins. *Pharmacogenetics* 14, 419-427.
19. Farfel, Z., Bourne, H.R., Iri, T. (1999): The expanding spectrum of G protein diseases. *N. E. J. of Medicine* 340, 1012-1020.
20. Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, A., Bourne, H.R. (1994): cAMP and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 7851-7854.
21. Ferrer, J., Nichols, C.G., Makhina, E.N., Salkhoff, L., Bernstein, J. (1995): Pancreatic cells express a family of inwardly rectifying K⁺ channel subunits which interact to form G-Protein activated channels. *J. Biol. Chem.* 270, 26086-26091.
22. Frey, U.H., Aral, N., Muller, N., Siffert, W. (2003): Cooperative effect of GNB3 825C>T and GPIIIa PI(A) polymorphisms in enhanced platelet aggregation. *Thromb. Res.* 109, 279-286
23. Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T., Shimonishi, Y. (1990): Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346, 658-660.
24. Garcia-Higuera, I., Gaitatzes, C., Smith, T.F., Neer, E.J. (1998): Folding a WD repeat propeller. *J. Biol. Chem.* 273, 9041-9049.

25. Gautam, N., Downes, G.B., Yan, K., Kisselev, O. (1998): The G-protein $\beta\gamma$ complex. *Cell Signal* 10, 447-455.
26. Gierschik, P., Sidiropoulos, D., Spiegel, A. M. & Jakobs, K. H. (1987): Purification and immunochemical characterisation of the major pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding protein of bovine -neutrophil membranes. *Eur. J. Biochem.* 165, 185-194.
27. Gilman, A.G. (1987): G-Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615.
28. Haga, T., Haga, K., Kameyama, K. (1994): G protein-coupled receptor kinases. *J. Neurochem.* 63, 400-412.
29. Hamm, H.E. (1998): The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 669-672.
30. Hansen, H.S., Nielsen, J.R., Hyldebrandt, N., Froberg, K. (1992): Blood pressure and cardiac structure in children with a parental history of hypertension: The odense schoolchild study. *J. Hypertens.* 10, 677-682.
31. Hengstenberg, C., Schunkert, H., Mayer, B., Doring, A., Lowel, H., Hense, H.W., Fischer, M., Riegger, G.A., Holmer, S.R. (2001): Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myokardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 49, 820-827.
32. Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992): G proteins. *TIBS*, 17, 381-387.
33. Hoffmann, G., Göbel, B., Harbrecht, U., Vetter, H., Düsing, R. (1992): Platelet cAMP and cGMP in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 5, 847-850.
34. Iiri, T., Bourne, H.R. (1998): G proteins propel surprise. *Nat. Genet.* 18, 8-10.
35. Inglese, J., Freedman, N.J., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (1993): Structure and mechanism of the G protein coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 268, 23735-23738.
36. Iñiguez-Lluhi, J. A., Kleuss, C. & Gilman, A. G. (1993): The importance of G protein $\beta\gamma$ subunits. *Trends Cell. Biol.* 3, 230-236.
37. Jones, D.T., Reed, R.R. (1989): Golf: An olfactory neuron specific G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790-795.
38. Jones, M.B., Siderovski, D.P., Hooks, S.B. (2004): The G $\beta\gamma$ dimer as a novel source of selectivity in G protein signaling: GGL-ing AT convention. *Mol. Interv.* 4, 200-214.

-
39. Kato, N., Sugiyama, T., Morita, H., Kurihara, H., Yamori Y., Yazaki, Y. (1998): G protein beta3 subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 32, 935-938.
40. Katz, A., Wu, D. Q. & Simon, M.I. (1992): Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate $\beta 2$ isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686-689.
41. Kerchner, K.R., Clay, R.L., McCleery, G., Watson, N., McIntire, W.E., Myung, C., Garrison, J.C. (2004): Differential sensitivity of phosphatidylinositol3-kinase $p110\gamma$ to isoforms of G protein $\beta\gamma$ dimers. *J.Biol.Chem.* 279, 44554-44562.
42. Larson., Hutchinson, R., Boerwinkle, E. (2000): Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 35, 1297-1300.
43. Lee, R.H., Liebermann, B.S., Yamane, H.K., Bok, D., Fung, G.K. (1992): A third form of the G protein beta subunit. 1. Immunochemical identification and localization to cone photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 267, 24776-24781.
44. Lesage, F., Dubrat, F., Fink, M., Guillemare, E., Coppola, T. (1994): Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G protein coupled K^+ channels in the brain. *FEBS Lett.* 353, 37-42.
45. Li, B., Fields, S. (1993): Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* 7, 957-963.
46. Li, D., Roberts, R. (2001): WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell.Mol.Life.Sci.* 58, 2085-2097.
47. Lifton, R.P. (1995): Genetic determinants of human hypertension. *PNAS* 92, 8545-8551.
48. Linder, M.E., Ewald, D.A., Miller, R.J., Gilman, A.G. (1990): Purification and characterization of $G\alpha$ and three types of $G\alpha$ after expression in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 265, 8243-8251.
49. Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., Clapham, D.E. (1987): The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* 325, 321-326.
50. Lupas, A.N., Lupas, J.M., Stock, J.B. (1992): Do G-protein subunits associate via a three-stranded coiled coil?. *FEBS Lett.* 314, 105-108.

-
51. Malbon, C.C. (2004): Insulin signalling: putting the 'G-' in protein-protein interactions. *Biochem. J.* 380, e11-e12.
52. Mattera, R., G. raziano, M.P., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A.G., Brown, A.M. (1989): Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science* 243, 804-807
53. Mayeenuddin, L.H., McIntire, W.H., Garrison, J.C. (2005): Differential sensitivity of P-Rex1 to isoforms of G protein beta gamma dimers. *J. Biol. Chem.* 2005, Online-Publikation; www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M506034200
54. Meirhaeghe, A., Bauters C., Helbecque, N., Hamon, M., McFadden, E., Lablanche, J.M., Bertrand, M., Amouyel, P. (2001): The human G-protein beta3 subunit C825T polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *Eur. Heart. J.* 22, 845-848.
55. Mende, U., Schmidt, C.J., Spring, D.J., Neer, E.J. (1995): The G-Protein γ subunit: requirements for dimerization with β subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 15892-15898.
56. Müller, S., Hekman, M., Lohse, M.J. (1993): Specific enhancement of β -adrenergic receptor kinase activity by defined G-Protein β and γ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10439-10443.
57. Muntz KH, Sternweis PC, Gilman AG, Mumby SM (1992): Influence of γ subunit prenylation on association of guanine nucleotide-binding regulatory proteins with membranes. *Mol. Biol. Cell.* 3, 49-61.
58. Neer, E. J., Lok, J. M., Wolf, L. G. (1984): Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulation unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 14222-14229.
59. Neer, E.J., Denker, B.M., Thomas, T.C., Schmidt, C.J. (1994): Analysis of G protein α and $\beta\gamma$ subunits by in vitro translation. *Methods in Enzymology* 237, 226-239
60. Neer, E.J., Schmidt, R.N., Smith, T.F. (1994): The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300.
61. Neer, E.J. (1995): Heterotrimeric G-proteins: organizer of transmembrane signals. *Cell.* 80, 249-257.
62. Norman, M.K. (1998): Clinical hypertension. 7. Ed. Williams & Wilkins

-
63. Pace, A.M., Faure, M., Bourne, H.R. (1995): Gi2 mediated activation of the MAP kinase cascade. *Mol. Biol. Cell* 6, 1685-1695.
64. Panchenko, M.P., Saxena, K., Li, Y., Charnecki, S., Sternweis, P.M., Smith, T.F., Gilman, A.G., Kozasa, T., Neer, E.J. (1998): Sites important for PLCbeta2 activation by the G protein betagamma subunit map to the sides of the beta propeller structure. *J. Biol. Chem.* 273, 28298-28304.
65. Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M., Sell, A., Busch, S., Roszkopf, D., Virchow, S., Esche, H., Brockmeyer, N., Jakobs, K.H., Siffert, W. (1996): Selectively enhanced cellular signalling by Gi proteins in essential hypertension. Gai2, Gai3, Gβ1 and Gβ2 are not mutated. *Circ. Res.* 79, 974-983.
66. Pitcher, J.A., Inglese, J., Higgins, J.B., Ariza, J.L., Casey, P.J. (1992): Role of βγ subunits in targeting the β-adenergetic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257, 1264-1267.
67. Pronin, A.N., Gautam, N. (1992): Interaction between G-protein β and γ subunit types in selective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6220-6224.
68. Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L.M., Robishaw, J.D. (1995): Isolation of cDNA clones encoding eight different human G Protein γ subunits, including novel forms designated the γ4, γ10, and γ11 subunits. *J. Biol. Chem* 270, 21765-21771.
69. Richardson, M., Robishaw, J.D. (1999): The α2A adrenergic receptor discriminate between Gi heterotrimeris of different βγ subunits composition in Sf9 Insect cell membranes. *J. Biol. Chem.* 274, 13525-13533.
70. Roszkopf, D., Siffert, G., Osswald, U., Witte, K., Düsing, R., Akkerman, J.W.N., Siffert, W. (1992): Platelet Na⁺/H⁺ exchange activity in normotensive and hypertensive subjects: effect of enalapril therapy upon antiport activity. *J. Hypertens.* 10, 839-847.
71. Roszkopf, D., Schröder, K.-J., Siffert, W. (1995): Role of sodium-hydrogen exchange in the proliferation of immortalised lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. *Cardiovasc. Res.* 29, 254-259.
72. Roszkopf, D., Manthey, I., Siffert, W. (2002): Identification and ethnic distribution of major haplotypes in the gene GNB3 encoding the G-protein beta3 subunit. *Pharmacogenetics* 12, 209-220.

-
73. Roskopf, D., Manthey, I., Habich, C., Kielbik, M., Eisenhardt, A., Nikula, C., Urban, M., Kohnen, S., Graf, E., Ravens, U., Siffert, W. (2003): Identification and characterisation of G beta 3s2, a novel splice variant of the G-protein beta 3 subunit. *Biochem. J.* 371, 223-232.
74. Saxena, K., Gaitatzes, C., Walsh, M.T., Eck, M., Neer, E.J., Smith, T.F. (1996): Analysis of the physical properties and molecular modeling of Sec13: a WD repeat protein involved in vesicular traffic. *Biochemistry* 35, 15215-15221.
75. Schmidt, C.J., Neer, E.J. (1991): In vitro synthesis of G protein $\beta\gamma$ dimers. *J. Biol. Chem.* 266, 4538-4544.
76. Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., Neer, E.J. (1992): Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 267, 13807-13810.
77. Schubert, B., VanDongen, A.M.J., Kirsch, G.E., Brown, A.M. (1989): Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science* 245, 516-519.
78. Schunkert, H., Hense, H.-W., Döring, A., Rieger, G.A.J., Siffert, W. (1998): Association between a polymorphism in the G protein $\beta 3$ subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 32, 510-513.
79. Semplicini, A., Siffert, W., Sartori, M., Monari, A., Naber, C., Frigo, G., Santonastaso, M., Cozzutti, E., Winnicki, M., Palatini, P. (2001): G protein beta3 subunit gene 825T allele is associated with increased left ventricular mass in young subjects with mild hypertension. *Am. J. Hypertens.* 14, 1191-1195.
80. Siffert, W. (2005): G-protein polymorphism in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu. Rev. Med.* 56: 17-28.
81. Siffert, W., Roskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., Jakobs, K.-H. (1995): Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J. Clin. Invest.* 96, 759-766.
82. Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., Horsthemke, B. (1998): Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension. *Nature genetics* 18, 45-48.

-
83. Siffert W., Forster, P., Jockel, K.H., Mvere, D.A., Brinkmann, B., Naber, C., Crookes, R., Du P Heyns, A., Epple, J.T., Fridey, J., Freedman, B.I., Muller, N., Stolke, D., Sharma, A.M., Al Moutaery, K., Grosse-Wilde, H., Buerbaum, B., Ehrlich, T., Ahmad, H.R., Horsthemke, B., Du Toit, E.D., Tiilikainen, A., Ge, J., Wang, Y., Roszkopf, D. (1999): Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in caucasian, chinese and black african. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1921-1930.
84. Siffert, W., Roszkopf, D., Erbel., R. (2000): Genetic polymorphism of the G-protein beta3 subunit, obesity and essential hypertension. *Herz* 25, 26-33.
85. Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., Neer, E.J. (1999): The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *TIBS* 24, 181-185.
86. Snapir, A., Heinonen, P., Tuomainen, T.P., Lakka, T.A., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Scheinin, M. (2001): G-protein beta 3 subunit C825T polymorphism: no association with risk for hypertension and obesity. *J. Hypertens.* 19, 2149-2155.
87. Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E., Sigler, P.B. (1996): Crystal structure of a G protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369-374.
88. Spiegel, A. M., Shenker, A. & Weinstein, L. S. (1992): Receptor-effector coupling by G proteins: Implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr. Rev.* 13, 536-565.
89. Spring, D.J., Neer, E.J. (1994): A 14-amino acid region of G protein γ subunit is sufficient to confer selectivity of γ binding to the β subunit. *J. Biol. Chem.* 269 no.36, 22882-22886.
90. Swales, J.D., de Bono, D.P. (1993): Cardiovascular risk factors. London, Gower Medical Publishing.
91. Tang, W., Gilman, A.G. (1991): Typespecific regulation of adenylyl cyclase by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* 254, 1500-1503.
92. Thomas, T.C., Sladek, T., Yi, F., Smith, T., Neer, E.J. (1993): G protein beta gamma subunit: physical and chemical characterization. *Biochemistry* 32, 8628-8635.
93. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. (1993): Effect of angiotensin II and endothelin-I on platelet aggregation and cytosolic pH and free Ca^{2+} concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 22, 853-862.

-
94. Tovey, S.C., Willar, G.B. (2004): Single-cell imaging of intracellular Ca^{2+} and phospholipase C activity reveals that RGS 2, 3, and 4 differentially regulate signaling via the G α_{q} /11-linked muscarinic M3 receptor. *Mol. Pharmacol.* 66, 1453-1464.
95. Tsutomu, H., Burnier, J., Ross, E.M. (1990): Regulation of Gi and G0 by mastoparan, related aphiphilic peptides and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.* 265, 14176-14186.
96. Van Biesen, T., Luttrell, M., Hawes, B.E., Lefkowitz, J. (1996): Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 17, 698-714.
97. Watson, J.A., Katz, A., Simon, M.I. (1994): A fifth member of the mammalian G protein β -subfamily: expression in brain and activation of the β -isotype of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 269, 22150-22156.
98. Yan, K., Kalyanaraman, V., Gautam, N. (1996): Differential ability to form the G protein $\beta\gamma$ complex among members of the β and γ subunit families. *J. Biol. Chem.* 271, 7141-7146.
99. Yan, K., Gautam, N. (1997) : Structural determinants for interaction with three different effectors on the G protein β subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 2056-2059.
100. Yoshikawa, D.M., Hatwar, M., Smrcka, A.V. (2000): G protein beta 5 subunit interactions with alpha subunits and effectors. *Biochemistry* 39, 11340-11347.
101. Yoshimura, M., Cooper, D.M. (1992): Cloning and expression of a Ca^{2+} inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6716-6720.

8. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylcyclase
AcNPV	Autographa californica nuclear Polyhedrosis virus
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AppNHp	Adenosin 5`-(β,γ -imino)triphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arg	Arginin
ARK	Adrenorezeptorkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BMH	BisMaleimidohexane
Ca	Kalzium
DNA	Desoxyribunucleid acid
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales Bovines Serum
fMLP	formyl-Methyl-Leucyl-Phenylalanin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
IP	Inositolphosphat
Kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
MAP Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAS -7	Mastoparan 7
MOI	Multiplicity of infection
NaCl	Natriumchlorid

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate - buffered saline
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonsäureflurid
PTX	Pertussis-Toxin
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Sf	Spondoptera frugiperda
TBS	TRIS-NaCl
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
Temed	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

9. Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Siffert, der diese Arbeit und insbesondere die Fertigstellung erst ermöglicht hat.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie, die mich tatkräftig in meiner praktischen Phase dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke insbesondere meinen Eltern, welchen ich mein Studium und somit diese Arbeit zu verdanken habe.

Für moralische Unterstützung während des Schreibens gilt ein besonderer Dank meinem Freund René.

10. Lebenslauf

Axel Erik Ludwig
geboren am 24.04.1974
in Riesenbeck, NRW
wohnhaft in Essen

Eltern: Rolf und Ingeborg Ludwig, geb. Brüning

Familienstand: ledig

Schul Ausbildung: 1980 – 1984 Grundschule Schüttorf
1984 – 1986 Orientierungsstufe Schüttorf
1986 – 1993 Burg Gymnasium Bad Bentheim, Abschluss
mit der allgemeinen Hochschulreife 5/93

Zivildienst: 08/1993 – 10/1994, Rettungssanitäterausbildung beim
DRK Nordhorn

Studium: 1994 – 2001 Studium der Humanmedizin an der
Universität Essen

Ab 1999 Dissertation am Pharmakologischen Institut
Universität Essen bei Herrn Prof. Dr. med. W. Siffert

Beruflicher Werdegang: 6/2001 – 12/2003 Arzt im Praktikum am St. Vincenz
Krankenhaus Essen, Kardiologie, bei Herrn Dr. med. R.
Jacksch

Seit 01/2003 Assistenzarzt am Lutherkrankenhaus Essen,
Innere Medizin, bei Herrn Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter
und Herrn Prof. Dr. med. D. Ameis